

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2005年8月18日 (18.08.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/075638 A1

(51)国際特許分類7: C12N 15/00, C12Q 1/68, C12M 1/00, G01N 27/30, 27/414

(21)国際出願番号: PCT/JP2005/001987

(22)国際出願日: 2005年2月3日 (03.02.2005)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ: 特願2004-26821 2004年2月3日 (03.02.2004) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人物質・材料研究機構(NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現1丁目2番1号 Ibaraki (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 宮原 裕二 (MIYAHARA,Yuji) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現1丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 坂田 利弥 (SAKATA,Toshiya) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現1丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP).

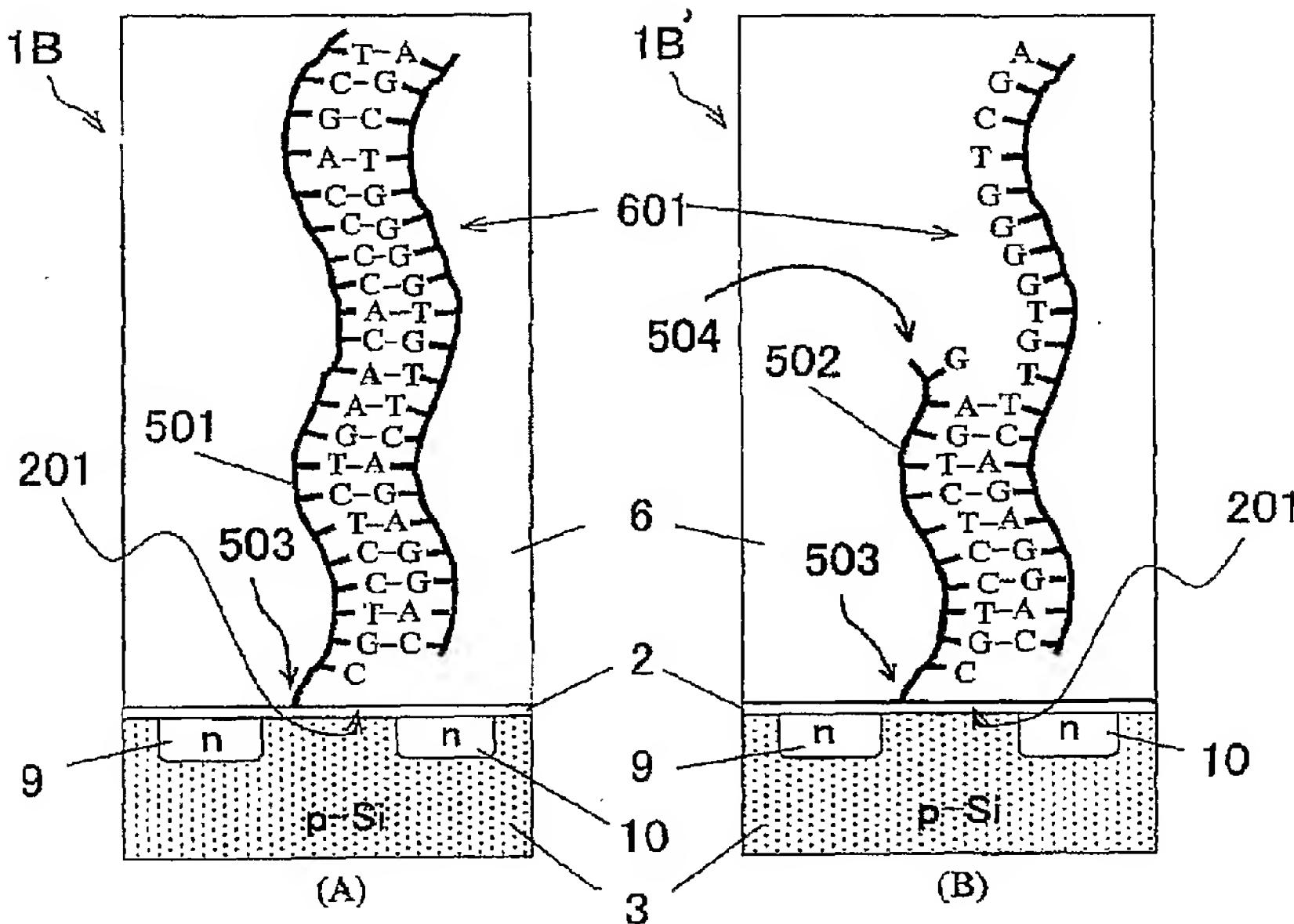
(74)代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA,Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

[続葉有]

(54) Title: GENE DETECTION FIELD-EFFECT DEVICE AND METHOD OF ANALYZING GENE POLYMORPHISM THEREWITH

(54)発明の名称: 遺伝子検出電界効果デバイスおよびこれを用いた遺伝子多型解析方法



(57) Abstract: A gene detection field-effect device comprising insulation film (2), semiconductor substrate (3) and reference electrode (4), characterized by including the following arrangements: (a) the insulation film (2) on its one surface side not only having nucleic acid probe (5) immobilized but also being in contact with sample solution (6) containing at least one type of detection analysis target gene (601); (b) the semiconductor substrate (3) disposed in contact with the other surface side of the insulation film (2); and (c) the reference electrode (4) arranged in the sample solution (6).

(57)要約: 絶縁膜体(2)、半導体基板(3)および参照電極(4)が備えられている遺伝子検出電界効果デバイスであって、以下の構成:(a)絶縁膜体(2)は、その一方の面側に

[続葉有]

WO 2005/075638 A1



BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

明 細 書

遺伝子検出電界効果デバイスおよびこれを用いた遺伝子多型解析方法

5 技術分野

この出願の発明は、遺伝子検出電界効果デバイスおよびこれを用いた遺伝子多型解析方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、高感度、かつ、高精度に遺伝子の検出解析が可能であり、しかも、遺伝子多型解析システムを従来よりも小型でコストをも抑えることのできる、新しい遺伝子検出電界効果デバイスおよびこれを用いた遺伝子多型解析方法に関するものである。

背景技術

ヒトゲノムの全塩基配列解読が終了し、他の生物のゲノム塩基配列解読が急速に進展する中、膨大な塩基配列情報が蓄積されつつある。これらのゲノム塩基配列情報をもとに、生体中における遺伝子の機能を明らかにすることにより、各種疾病的診断、医薬品の開発、農作物の品種改良など広範囲な分野で遺伝子関連技術の開発が飛躍的に進むものと考えられる。これらの新規分野発展の基礎となるのが、塩基配列情報に加えて、遺伝子の発現および機能情報である。

遺伝子の機能および遺伝子の発現解析を大規模に行い、遺伝子検査へ発展させる技術として、DNAチップあるいはDNAマイクロアレイ（以下、両者を総称してDNAマイクロアレイとする）が開発されている。しかし、現状のDNAマイクロアレイの多くは、蛍光検出を基本原理としているので、レーザや複雑な光学系システムが必要となり、システムが大型化して高価であるという問題があった。

また、現在開発されているほとんどのDNAマイクロアレイは、ハイブリダイゼーションに基づく二本鎖DNAの検出を基本原理としており、反応の選択性があまり高くないため、遺伝子多型解析の精度に問題があった。特に医療の分野では、テーラーメイド医療の実現には、遺伝子多型、もしくは、一塩基多型

(Single Nucleotide Polymorphism, SNP ; 以下、SNP と略記することがある) を高精度に、かつ、簡便に検出する必要がある。したがって、簡便性と高精度化の両方を満足させる技術が求められている。

これらの問題を解決する方法として、酸化・還元標識と組み合わせた電流検出方式の DNA マイクロアレイがいくつか報告されている。たとえば、分子ワイヤーと称する分子の一端を金属電極上に固定化し、他端に核酸プローブを結合させ、目的遺伝子とのハイブリダイゼーションに基づく酸化・還元標識と金属電極の電子の授受を電流変化として検出して、目的遺伝子を検出する方式が開発されている（非特許文献 1 および非特許文献 2）。

また、電気化学的活性のある標識剤として、Ferrocenylnaphthalene Diimide を用いて、金属電極における酸化・還元電流を計測することにより、ハイブリダイゼーションを検出する方式が開発されている（非特許文献 3）。さらに、電流検出方式 DNA チップを用いて、C 型肝炎の薬効検査システムが開発されている（非特許文献 4）。この方式では、高価なレーザや複雑な光学系システム等を必要としないため、簡単で小型のシステムを構築することができる。

しかしながら、これら非特許文献 1 から 4 の方式の場合は、金属電極上での酸化・還元反応を検出の基本原理としているため、試料中に酸化物質あるいは還元物質（たとえば、アスコルビン酸等）が存在すると、酸化、または、還元に基づく電流が流れてしまい、遺伝子検出の妨害となって検出の精度が劣化するという問題があった。また、電流計測に伴い、金属電極上で電極反応が進行する。電極反応は、不可逆で非平衡反応であるため電極の腐食、ガスの生成等が生じて、固定化した核酸の剥離や電流測定の安定性が損なわれたりするので、特に繰返し測定する場合に検出精度が劣化するという問題があった。

さらにまた、電界効果デバイスを用いて、DNA のハイブリダイゼーションを検出する試みも報告されている（非特許文献 5）。これは、DNA 分子が溶液中で負電荷を有していることを利用し、電界効果を利用してハイブリダイゼーションによる電荷変化を検出するものである。しかしながら、基板上に形成される DNA プローブはもともと負電荷を有しているため、目的遺伝子のハイブリダイゼー

ションによる電荷の変化分は小さく、非特異的な吸着との区別ができないなど遺伝子検査のためには高感度化、精度向上が課題であった。また、一塩基多型(SNP)のように2つの遺伝子間における、わずかの違い(一塩基の違い)を検出するには、感度および精度(選択性)が共に悪く、困難であった。

5 非特許文献1: Nature Biotechnology, vol. 16, p27-31, 1998
非特許文献2: Nature Biotechnology, vol. 16, p40-44, 1998
非特許文献3: Anal. Chem., 72, p1334-1341, 2000
非特許文献4: Intervirology, 43, p124-127, 2000
非特許文献5: J. Phys. Chem. B., 101, p2980-2985, 1997

10

発明の開示

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、高感度、かつ、高精度に遺伝子の検出、解析が可能であり、しかも、遺伝子多型解析システムを従来よりも小型でコストをも抑えることのできる、新しい遺伝子検出電界効果デバイスおよびこれを用いた遺伝子多型解析方法を提供することを課題としている。

この出願の発明は、上記の課題を解決する手段として、以下の(1)から(9)の発明を提供する。

(1) 絶縁膜体、半導体基板および参照電極が備えられている遺伝子検出電界効果デバイスであって、以下の構成:

(a) 絶縁膜体は、その一方の面側に核酸プローブが固定化されているとともに、少なくとも1種類の目的遺伝子が含まれる試料溶液に接触されていること;

(b) 半導体基板は、前記絶縁膜体の他方の面側に当接設置されていること;

25 および

(c) 参照電極は、前記試料溶液中に備えられていること;
を含んでなることを特徴とする遺伝子検出電界効果デバイス;

(2) 上記(1)記載の遺伝子検出電界効果デバイスが、少なくとも2つ以上備えられており、かつ、これら遺伝子検出電界効果デバイスそれぞれの絶縁膜体上には目的遺伝子の塩基配列と相補的な塩基配列を有する野生型(正常型)核酸プローブと、目的遺伝子の塩基配列と非相補的な塩基配列を有する変異型核酸プローブの少なくとも2種類以上の核酸プローブが固定化されてなることを特徴とする遺伝子検出電界効果デバイス；

(3) 変異型核酸プローブは、核酸プローブが絶縁膜体上に固定化されていない端部である非固定化端部における塩基が、野生型核酸プローブの非固定化端部における塩基と異なっている(2)記載の遺伝子検出電界効果デバイス；

(4) 核酸プローブは、オリゴヌクレオチド、相補的DNA(cDNA)およびペプチド核酸(PNA)からなる群より少なくとも1種類以上が選択される(1)から(3)いずれか記載の遺伝子検出電界効果デバイス；

(5) 核酸プローブは、金属電極を介して固定化されている(1)から(4)いずれか記載の遺伝子検出電界効果デバイス；

(6) 金属電極は、白金、金、銀、パラジウム、チタンおよびクロムからなる群より少なくとも1種類以上が選択される(5)記載の遺伝子検出電界効果デバイス；

(7) ヒーターおよび温度センサが、さらに集積化されている(1)から(6)いずれか記載の遺伝子検出電界効果デバイス；

(8) 上記(1)から(7)いずれか記載の遺伝子検出電界効果デバイスを用いて、遺伝子多型を解析する方法であって、以下のステップ：

(a) 絶縁膜体に固定化されている核酸プローブと少なくとも目的遺伝子が含まれている試料溶液とを接触させることにより、絶縁膜体上で前記核酸プローブと前記目的遺伝子とをハイブリダイズさせるステップ；

(b) 洗浄液を絶縁膜体上に導入して、未反応の前記目的遺伝子を除去するステップ；

(c) 伸長反応における酵素であるタックDNAポリメラーゼ(Taq DNA polymerase)および基質となるデオキシアデノシン三リン酸(dATP)、デオキ

シグアノシン三リン酸 (dGTP) 、デオキシシチジン三リン酸 (dCTP) 、デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) を絶縁膜体上に導入して伸長反応を行うステップ；

(d) 洗浄液を絶縁膜体上に導入して、未反応の酵素および基質を除去するス

5 テップ；および

(e) 緩衝液を絶縁膜体上に導入して、遺伝子検出電界効果デバイスの出力値を測定するステップ；

を含むことを特徴とする遺伝子多型解析方法；および

(9) ステップ (e) の出力値の測定は、野生型核酸プローブが固定化されてい

10 る第 1 の遺伝子検出電界効果デバイスと絶縁膜体上に核酸プローブが固定化されていない第 3 の遺伝子検出電界効果デバイスとの差動出力値 V1 を測定し、また、変異型核酸プローブが固定化されている第 2 の遺伝子検出電界効果デバイスと前記第 3 の遺伝子検出電界効果デバイスとの差動出力値 V2 を測定し、V1 が V2 より大きいパターン ($V1 > V2$) 、V1 と V2 とが同程度であるパターン

15 ($V1 \approx V2$) および V1 が V2 より小さいパターン ($V1 < V2$) の 3 種類のパターンに分類して表示する (8) 記載の遺伝子多型解析方法。

図面の簡単な説明

図 1 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスの一実施形態を模式

20 的に例示した断面図である。

図 2 は、図 1 の遺伝子検出電界効果デバイスの検出原理を概略的に例示したグラフ図である。

図 3 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスによる遺伝子検出電界効果トランジスタの一例を模式的に示した断面図である。

25 図 4 は、図 3 の遺伝子検出電界効果トランジスタの検出原理を概略的に例示したグラフ図である。

図 5 は、この出願の発明による遺伝子検出電界効果デバイスからなる遺伝子検出電界効果トランジスタにおいて、一塩基異なる核酸プローブが固定化され

ている状態を模式的に例示した断面図であり、(A) は野生型核酸プローブが固定された遺伝子検出電界効果トランジスタを、(B) は変異型核酸プローブが固定された遺伝子検出電界効果トランジスタを示している。

図 6 は、図 5 の遺伝子検出電界効果トランジスタにおけるそれぞれの伸長反

5 応の状態を模式的に例示した断面図であり、(A) は野生型核酸プローブが固定された遺伝子検出電界効果トランジスタを、(B) は変異型核酸プローブが固定された遺伝子検出電界効果トランジスタを示している。

図 7 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスからなる遺伝子検出

電界効果デバイスにおいて、金属電極を介して核酸プローブを固定化させた状

10 態を模式的に例示した断面図であり、(A) は野生型核酸プローブが固定された遺伝子検出電界効果トランジスタを、(B) は変異型核酸プローブが固定された遺伝子検出電界効果トランジスタを示している。

図 8 は、図 7 において、インターラーカレーターを核酸プローブに反応させた状

態を模式的に例示した断面図であり、(A) は野生型核酸プローブが固定された

15 遺伝子検出電界効果トランジスタを、(B) は変異型核酸プローブが固定された遺伝子検出電界効果トランジスタを示している。

図 9 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスからなる遺伝子検出

電界効果デバイスからなる遺伝子検出電界効果トランジスタにヒーターと温度

センサを集積化した状態を模式的に例示した断面図である。

20 図 10 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスからなる遺伝子検出電界効果トランジスタをアレイ化した実施形態を模式的に例示した断面図である。

図 11 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスを用いた測定システムの全体構成を模式的に例示した概略図である。

25 図 12 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスを搭載するフローセルを模式的に例示した断面図である。

図 13 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスによる測定プロトコルの概略的に例示した説明図である。

なお、図中の符号は次のものを見ている。

- 1 A 遺伝子検出電界効果デバイス
- 1 B、1 B' 遺伝子検出電界効果トランジスタ
- 1 C 遺伝子検出電界効果トランジスタアレイ
- 5 2 絶縁膜体
- 2 0 1 ゲート絶縁膜体領域
- 3 半導体基板
- 4 参照電極
- 5 核酸プローブ
- 10 5 0 1 野生型核酸プローブ
- 5 0 2 変異型核酸プローブ
- 5 0 3 固定化端部
- 5 0 4 非固定化端部
- 6 試料溶液
- 15 6 0 1 目的遺伝子
- 7 ゲート電極
- 8 電子
- 9 ソース n 型領域
- 10 ドレイン n 型領域
- 20 1 1 ドレイン電極
- 1 2 ドレイン電流計
- 1 3 金属電極
- 1 4 インターカレーター
- 1 5 ヒーター
- 25 1 6 温度センサ
- 1 7 p ウェル
- 1 8 シリコン基板
- 1 9 絶縁膜体

20 熱伝導性物質
21 開口部
22 銅板
23 ペルチエ素子
5 24 フローセル
25 流路
26 試料
27 試薬
28 緩衝液
10 29 洗浄液
30 バルブ
31 ポンプ
32 分注器
33 廃液ボトル
15 34 参照電極
35 3M KCl 溶液
36 液-液接合
37 信号処理回路
38 プリント基板
20 39 ワイヤー
40 ピン
41 保護キャップ

発明を実施するための最良の形態

25 この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について詳しく説明する。

この出願の発明の特長は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスと分子生物学的反応とを組み合わせることにより、2つの遺伝子間における一塩

基の違いを検出・解析、すなわち、遺伝子多型、もしくは、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) の検出・解析を高感度に、しかも高精度に行うことことができる。以下に、図1から図13に沿って、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスとこれを用いた高精度な SNP 解析の
5 方法を説明する。

図1は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイスにおける一実施形態を模式的に例示した断面図である。

図1に示したとおり、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイス (1A) は、少なくとも絶縁膜体 (2)、半導体基板 (3)、参照電極 (4) が備
10 えられている。

絶縁膜体 (2) の一方の表面側には、核酸プローブ (5) が固定化され
15 いるとともに、少なくとも前記目的遺伝子を含む試料溶液 (6) と接触されて
いる。この核酸プローブ (5) は、検出・解析の対象である目的遺伝子 (後述)
と結合 (ハイブリダイズ) することのできる、目的遺伝子の塩基配列と相補的
な塩基配列を有している。また、絶縁膜体 (2) の他方の表面側には、半導体
基板 (3) が設置されていることを特徴とした構造を有している。なお、半導
体基板 (3) は、その機能を有するものであれば材質は特に制限されるもので
はなく、たとえば、p-Si4 (シリコン)、ゲルマニウム等を使用することができる。
20

また、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイス (1A) では、試料溶
液 (6) の中に参照電極 (4) が備えられており、半導体基板 (3) と電気的
に接続されている。そして、必要に応じてゲート電極 (7) を設け、電圧 V_G を
印加することもできる。

核酸プローブ (5) については、検出・解析の対象とする目的遺伝子と結合
25 し、検出・解析することができるのであれば、その形態や長さ等は、特に制限
されるものではないが、たとえば、天然オリゴヌクレオチド、人工オリゴヌク
レオチド、cDNA 断片、ペプチド核酸等を用いることが好ましい。長さについては、通常 300 個以下の塩基から構成されていることが好ましく、特に天然また

は人工オリゴヌクレオチドを使用する場合は、80個以下の塩基からなる核酸断片であることがより好ましい。

上記絶縁膜体（2）は、二酸化シリコン（ SiO_2 ）、窒化シリコン（ SiN または Si_3N_4 ）、酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）、酸化タンタル（ Ta_2O_5 ）等の材料を単独、
5 または、これらを組み合わせて用いることができ、通常は半導体基板（3）表面の電気的特性を良好に保つため、酸化シリコン（ SiO_2 ）の上に、窒化シリコン（ SiN ）、酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）、酸化タンタル（ Ta_2O_5 ）等を積層して二層構造とすることが好ましい。

上記絶縁膜体（2）表面に核酸プローブ（5）を固定化するためには、まず、
10 核酸プローブ（5）の一端をアミノ基（ NH_2 基）、チオール基（ SH 基）、ビオチン等で化学修飾する。たとえば、アミノ基で化学修飾した核酸プローブ（5）を用いる場合は、絶縁膜体（2）の表面をアミノプロピルエトキシシラン、ポリリジン等で化学修飾して、絶縁膜体（2）表面にアミノ基を導入し、グルタルアルデヒドやフェニレンジイソシアネート（PDC）と反応させ、前記のアミノ基で化学修飾した核酸プローブ（5）を絶縁膜体（2）表面に固定化する。
15

また、チオール基で化学修飾した核酸プローブ（5）を絶縁膜体（2）表面に固定化する場合は、絶縁膜体（2）上に金薄膜を形成させ、チオール基と金との親和性を利用して、核酸プローブ（5）を固定化することもできる。さらにまた、ビオチンで化学修飾した核酸プローブ（5）を固定化する場合は、絶縁膜体（2）表面にストレプトアビジンを導入し、ビオチンとストレプトアビジンの親和性を利用して、核酸プローブ（5）を絶縁膜体（2）表面に固定化する。

実際の核酸プローブ（5）の固定化に際しては、絶縁膜体（2）表面にのみ核酸プローブ（5）を含む溶液を滴下、または、スポットし、絶縁膜体（2）上の官能基と化学反応を行わせて核酸プローブ（5）を固定化する。なお、核酸プローブ（5）は、金属電極を介して固定化されていてもよい。金属電極としては、たとえば、白金、金、銀、パラジウム、チタン、クロム等を使用することができる。

試料溶液（6）中には、検出・解析の対象となる目的遺伝子を含む多数の遺伝子が含まれている。そして、上記のとおり、この目的遺伝子の塩基配列と相補的塩基配列を有する核酸プローブ（5）が、遺伝子検出電界効果デバイス（1 A）の絶縁膜体（2）上に固定化されていることにより、適切な反応条件の下で目的遺伝子と核酸プローブ（5）が結合（ハイブリダイズ）されて二本鎖を形成させることができる。

そして、さらに、遺伝子の伸長反応を行うための試薬類（Taq ポリメラーゼや dATP、dGTP、dCTP、dTTP 等）を試料溶液（6）に導入するとともに、遺伝子検出電界効果デバイス（1 A）に加熱操作および／または冷却操作等の温度コントロールを施すことにより、前記目的遺伝子と核酸プローブ（5）とがハイブリダイズして形成された二本鎖サンプルのみを効率よく伸長反応させることができる。つまり、試料溶液（6）中に含まれる目的遺伝子ではない遺伝子とは、固定化された核酸プローブ（5）とはハイブリダイズして二本鎖を形成することができないため、当然に伸長反応は促進されることはない。

上記の遺伝子検出電界効果デバイス（1 A）における温度コントロール手段としては、たとえば、後述の図 9 の例示したとおり、ヒーター（15）および温度センサ（16）を集積化することで、ハイブリダイゼーションおよび伸長反応の反応温度を最適値に制御することができ、遺伝子検出電界効果デバイス（1 A）の絶縁膜体（2）上でのハイブリダイゼーションおよび伸長反応を高精度に行わせることができる。

そして、反応に用いる緩衝溶液の pH の適切な条件下では、核酸は負に帯電している。したがって、上記のとおり二本鎖形成して伸長反応が促進されることにより、絶縁膜体（2）表面の負電荷が増大し、その結果、静電的相互作用によりシリコン等からなる半導体基板（3）表面におけるキャリア、すなわち電子（8）密度が変化する。この電子（8）密度の変化に伴う電気的信号を検出することで、高感度で、高精度に SNP の解析を行うことができる。

なお、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイス（1 A）の出力値は、この緩衝液の pH に依存しており、特に pH が 7 以下であるときには有意な差が

得られ、また、高い信号／雑音比（S/N 比）を得るためにには、この pH を 4 以下とすることが好ましい。

図 2 は、半導体基板表面のキャリア密度変化を遺伝子検出電界効果デバイスのキャパシタンスの変化として検出する一例を示した概念図である。

5 この図 2 は、参照電極と半導体基板（シリコン）の電気的端子をキャパシタンスマーターに接続し、 V_c 電圧を掃引しながら数ヘルツから 1 メガヘルツまでの周波数の微小（50mV 程度）電圧を重畠させて印加時における、キャパシタンス—電圧特性の変化の状態を例示している図である。

10 p 型シリコンを用いる場合は、 V_g の変化により、半導体基板表面の空乏層容量が変化し、測定される全キャパシタンス— C_c は、絶縁膜体の容量と半導体基板表面の空乏層容量との和となるため、図中の符号 A に示した特性となる。半導体基板のシリコン中のエネルギー-band がフラットになる電圧をフラットバンド電圧といい、キャパシタンス—電圧特性を特徴付ける指標になる。そして、符号 A で示しているキャパシタンス—電圧特性のフラットバンド電圧を V_{F1} とする。絶縁膜体表面で核酸プローブと目的遺伝子がハイブリダイズして二本鎖を形成すると、表面の負電荷密度が増大するので、キャパシタンス—電圧特性は電圧軸に沿って正方向にシフトし、図中の符号 B に示した特性となる。この時のフラットバンド電圧を V_{F2} とすると、フラットバンド電圧のシフト量 $\Delta V_F = V_{F2} - V_{F1}$ （矢印 D）は、絶縁膜体表面の電荷密度変化に依存するので、 ΔV_F を測定することにより、ハイブリダイゼーションを評価することができる。

20 さらに、絶縁膜表面で、DNA の伸長反応を行わせると、二本鎖の長さが長くなるため表面の負電荷がさらに増大する。つまり、キャパシタンス—電圧特性はさらに正方向にシフトし、図中の符号 C に示した特性になる。そして、この時のフラットバンド電圧を V_{F3} とすると、フラットバンド電圧のシフト量 $\Delta V_F = V_{F3} - V_{F1}$ （矢印 E）は、伸長反応による電荷密度変化の指標になり、ハイブリダイゼーションのみの時のシフト量よりも大きいため、高感度測定が可能になる。

25 図 3 は、図 1 に例示した遺伝子検出電界効果デバイス（1 A）において、半導体基板（3）である p 型シリコン（p-Si）の表面近傍にソース、ドレインと

して、それをソース n 型領域 (9) 、ドレイン n 型領域 (10) を設けて、遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) を構成した遺伝子検出電界効果デバイス (1A) を模式的に例示した断面図である。なお、遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) を単に遺伝子検出電界効果デバイス (1A) と表記するこ
5 とがある。

図3に示したとおり、ソース n 型領域 (9) 、ドレイン n 型領域 (10) 間に電圧 V_D を印加するためのドレイン電極 (11) を設け、その時に流れるソース n 型領域 (9) 、ドレイン n 型領域 (10) 間の電流 I_D をドレイン電流計 (12) で測定する。核酸プローブ (5) は、ソース n 型領域 (9) 、ドレイン n 型領域 (10) 間の絶縁膜体 (2) 表面（以後、この領域を「ゲート絶縁膜体領域 (201)」と記すことがある）に固定化する。試料溶液 (6) 中に検出解析すべき目的遺伝子が含まれ、遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) のゲート絶縁膜体領域 (201) 上に目的遺伝子と相補的な塩基配列を有する核酸プローブ (5) が固定化されていると、目的遺伝子と核酸プローブ
10 (5) が、ハイブリダイズして二本鎖を形成する。
15

そして、図1および図2の例と同様に、ハイブリダイズによる二本鎖形成によりゲート絶縁膜体領域 (201) 表面の負電荷が増大し、その結果、静電的相互作用により半導体基板表面における電子 (8) 密度が変化し、これに伴う電気的信号を検出する。

20 図4は、半導体基板表面のキャリア密度変化を遺伝子検出電界効果デバイスのゲート電圧 V_G ードレイン電流 I_D 特性変化として検出する一例を示した概念図である。ソース、ドレイン間に一定の電圧 V_D を印加した状態で、ゲート電圧 V_G に負の電圧を印加すると静電的相互作用により、p 型半導体基板表面から少数キャリアである電子がなくなり、多数キャリアである正孔が蓄積する。一方、ソ
25 ース、ドレインは、n 型領域であるので、ソース、ドレイン間電圧 V_D を印加すると、ソース、ドレインのどちらかに必ず pn 接合の逆方向電圧が印加されるため、ドレイン電流 I_D は流れない（無視できるほど小さい）。

そして、徐々にゲート電圧 V_G を増加していくと、電子が表面に誘起されて表面の電子密度が増加する。十分な大きさのゲート電圧 V_G を印加するとソース、ドレインの n 型領域は、半導体基板表面に誘起された電子の層で接続され、高い導電性を示してドレイン電流 I_D が流れ出すこととなる。ドレイン電流 I_D が流れ出すときのゲート電圧 V_G を閾値電圧 V_T といい、 $V_G - I_D$ 特性を特徴づける指標となる。さらに、ゲート電圧 V_G を正の方向に印加していくと、半導体基板表面の電子密度が増加して、ドレイン電流 I_D は増加する。したがって、図 4 中の符号 A' に示した特性となり、この時の閾値電圧を V_{T1} とする。ゲート絶縁膜体表面で、核酸プローブと目的遺伝子がハイブリダイズして二本鎖を形成すると、表面の負電荷密度が増大するので、 $V_G - I_D$ 特性は電圧軸に沿って、正方向にシフトし、図 4 中の符号 B' に示した特性となる。この時の閾値電圧を V_{T2} とすると、閾値電圧のシフト量 $\Delta V_T = V_{T2} - V_{T1}$ (矢印 D') は、ゲート絶縁膜体領域表面の電荷密度変化に依存するので、 ΔV_T を測定することにより、ハイブリダイゼーションを評価することができる。さらに、ゲート絶縁膜体領域表面で DNA の伸長反応を行わせると、二本鎖の長さが長くなるため表面の負電荷がさらに増大する。したがって、 $V_G - I_D$ 特性はさらに正方向にシフトし、図 4 中の符号 C' に示した特性になる。この時の閾値電圧を V_{T3} とすると、閾値電圧のシフト量 $\Delta V_T = V_{T3} - V_{T1}$ は伸長反応による電荷密度変化の指標になり、ハイブリダイゼーションのみの時のシフト量よりも大きいため、高感度な測定、すなわち検出が可能になる。

図 5 は、この出願の発明の遺伝子検出電界効果デバイス (1 A) からなる遺伝子検出電界効果デバイス (1 B) を 2 つ備え、また、遺伝子検出電界効果デバイス (1 B) それぞれに異なる核酸プローブ (5) を固定化させて、目的遺伝子 (6 0 1) とハイブリダイズさせている状態を模式的に例示した断面図であり、(A) は目的遺伝子の塩基配列と完全に相補的な塩基配列を有する核酸プローブ (野生型) を固定化させた状態、(B) は目的遺伝子の塩基配列とは一塩基だけ異なる核酸プローブ (変異型) を固定化させた状態を示している。

また、図 6 は、図 5 の例において、伸長反応を促進させた状態を模式的に例示した断面図であり、(A) は目的遺伝子と核酸プローブが伸長している状態、

(B) は目的遺伝子と核酸プローブの伸長反応が停止している状態を示している。なお、この図 5 および図 6 における基本的な構成は、図 3 の例と略同様である。

図 5 および図 6 に示したとおり、この出願の発明は、上記のとおりの遺伝子検出電界効果トランジスタ (1 B) を少なくとも 2 つ以上備えて、これら遺伝子検出電界効果トランジスタ (1 B) それぞれの絶縁膜体 (2) 上に、少なくとも 2 種類の核酸プローブ (5) が固定化されてなる遺伝子検出電界効果トランジスタ (1 B) を用いることにより、SNP の解析を高感度に、また、高精度に行うことができる。

上記の少なくとも 2 種類の核酸プローブ (5) とは、解析の対象となる目的遺伝子 (6 0 1) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する野生型 (正常型) 核酸プローブ (5 0 1) と、前記目的遺伝子 (6 0 1) の塩基配列とは非相補的な塩基配列を有する変異型核酸プローブ (5 0 2) を意味する。この変異型核酸プローブ (5 0 2) については、核酸プローブ (5) が絶縁膜体 (2) 上に固定化されている端部である固定化端部 (5 0 3) の反対側の端部、つまり、核酸プローブ (5) が固定化されていない端部である非固定化端部 (5 0 4) における塩基が、野生型核酸プローブ (5 0 1) の非固定化端部 (5 0 4) における塩基と相異していることが好ましい。図 5 (B) の例では、変異型核酸プローブ (5 0 2) の非固定化端部 (5 0 4) における塩基は「G」であり、この箇所に対応する目的遺伝子の塩基は「T」となっているため、結合は途中で停止し、二本鎖を形成することができない。一方、野生型核酸プローブ (5 0 1) の非固定化端部 (5 0 4) における塩基は「A」であり、この箇所に対応する目的遺伝子の塩基「T」とは相補的な関係にあり、結合して二本鎖を形成することができる。

そして、目的遺伝子 (6 0 1) の塩基配列が含まれる試料溶液 (6) を上記遺伝子検出電界効果デバイス (1 A) からなる電界効果デバイス (1 B) の絶縁膜体 (2) 上に導入して、ハイブリダイゼーションを行わせ、未反応の目的遺伝子 (6 0 1) を緩衝溶液等で洗浄する。次いで、タック DNA ポリメラーゼ (Taq DNA ポリメラーゼ) 等の DNA 合成酵素とともに、基質となるデオキシアデ

ノシン三リン酸 (dATP) 、デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP) 、デオキシシチジン三リン酸 (dCTP) 、デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) を用いて、DNA の伸長反応、あるいは、インターラーカー分子との反応等の分子生物学的反応工程を絶縁膜体 (2) 表面上で引き続き行わせ、未反応の酵素や基質を洗浄する。その結果、DNA 伸長反応等で生ずる表面電荷密度の変化を電界効果を利用して、半導体基板 (3) 表面に静電的に誘起する電子 (8) 密度の変化を検出する。

表面電荷密度の変化を大きくして、高感度測定を実現するために、目的遺伝子 (601) 自身が持っている負電荷に加えて、核酸の伸長反応による負電荷の増大とその結果起こる信号のエンハンスメントやインターラーカーとの反応による正電荷の導入等により、ハイブリダイゼーションの現象を大きな信号／雑音比 (S/N 比) で検出できる。つまり、それぞれの遺伝子検出電界効果デバイス (1A) の出力を比較することにより解析の対象となる目的遺伝子 (601) の遺伝子型 (つまり、SNP) を解析することができる。

また、絶縁膜体 (2) 表面に固定化する核酸プローブ (5) の塩基配列設計に際しては、上記のとおり、ミューテーション (変異) の位置を絶縁膜体 (2) 表面への固定化端部 (503) とは反対側の端部である非固定化端部 (504) に設定する。そして、目的遺伝子 (601) の SNP における野生型 (正常型) に対応する野生型核酸プローブ (501) と変異型に対応する変異型核酸プローブ (502) とを別々に固定化させて、1種類の試料溶液 (6) に対して、同時にハイブリダイゼーションを行わせ、伸長反応を行わせることにより、一塩基多型 (SNP) を高精度に測定することができる。

さらに、ハイブリダイゼーション時の温度を野生型核酸プローブ (501) 、または、変異型核酸プローブ (502) の解離温度 (T_m) に設定することにより、ハイブリダイゼーションの選択性を向上させることができ、伸長反応を行わせることで、反応の特異性をさらに高めることができ、より高精度の SNP 解析が可能となる。

これは、ミューテーションの位置が端にあるミスマッチの変異型核酸プローブ (502) とのハイブリダイゼーションでは、塩基同士の親和性が低いため十分に結合されず、伸長反応が起こらないためである。一方、フルマッチの野生型核酸プローブ (501) では非固定化端部の塩基同士は水素結合で確実に 5 二本鎖を形成するため、伸長反応が起こり、負電荷が増大する。これにより、静電的相互作用で半導体表面の電子 (8) 密度が変化し、これに伴う電気的特性の変化を測定することにより高精度に SNP を解析することができる。

つまり、この出願の発明における遺伝子多型解析方法は、特に出力値の測定については、野生型核酸プローブ (501) が固定化されている第 1 の遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) (遺伝子検出電界効果デバイス) と、絶縁膜体上にはいずれの核酸プローブが固定化されていない第 3 の遺伝子検出電界効果トランジスタ (図示せず) (遺伝子検出電界効果デバイス) との差動出力値 V1、また、変異型核酸プローブ (502) が固定化されている第 2 の遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B') (遺伝子検出電界効果デバイス) および 15 前記第 3 の遺伝子検出電界効果トランジスタ (遺伝子検出電界効果デバイス) との差動出力値 V2 を測定し、この測定結果に基づいて、V1 が V2 より大きいパターン ($V1 > V2$)、V1 と V2 とが同程度であるパターン ($V1 \approx V2$)、V1 が V2 より小さいパターン ($V1 < V2$) の 3 種類のパターンに分類して表示することに基づいている。

20 図 7 は、この出願の発明において、金属電極 (13) を介して核酸プローブ (5) を絶縁膜体 (2) に固定化させた状態を模式的に例示した断面図である。金属電極 (13) は、前記のとおり、白金、金、銀、パラジウム、チタン、クロム等を使用することができ、これにより、前記の電子 (8) の密度変化に伴う電気的特性の変化をより高精度に検出することができる。

25 さらに、図 8 は、この出願の発明において、インターラーティー (14) を反応させた状態を模式的に例示した断面図である。

インターラーティー (14) は、二本鎖核酸とのみ反応し、また溶液中ではイオン化し、正に帯電するため、この性質を利用して、インターラーティー

(14) を導入して、伸長反応により長く伸びた野生型核酸プローブ (501) が固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) の二本鎖核酸とより多く反応し、大きな信号変化が得られる。この信号変化を検出する。なお、インターラーカー (14) としては、たとえば、Hoechst33258 やエチジウムプロマイド、サイバーグリーン、ピコグリーン等を用いることができる。

図9は、この出願の発明の別の実施形態を模式的に例示した断面図である。なお、基本的な構成等は、図3、図5または図6に示した例と略同様である。

この図9に例示したこの出願の発明においては、図3、図5または図6に例示した遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) が形成された半導体基板

(3) に、核酸の伸長反応を促進させるための温度コントロール手段として、ヒーター (15) をヒーター用 n 型領域として形成させ、また、温度センサ (16) は温度センサ用 p n 接合として形成させている。この時、一つの半導体基板 (3) に複数個の p ウェル (17) を形成させて、前記ヒーター (15) および温度センサ (16) を集積化させている。遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) のゲート絶縁膜体領域 (201) 上には、野生型核酸プローブ (501)、変異型核酸プローブ (502) それぞれが固定化され、試料溶液 (6) 中の目的遺伝子 (601) とハイブリダイゼーションおよび伸長反応を促進させて、高精度な SNP 解析を行うことができる。その際、ヒーター (15) および温度センサ (16) とを作動させて、半導体基板 (3) 近傍の試料温度を、ハイブリダイゼーション時には 45°C 、伸長反応時には 62°C に設定し制御した。このように遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) に、温度コントロール手段として、ヒーター (15) および温度センサ (16) を集積化することにより、ハイブリダイゼーションおよび伸長反応時の温度を最適な値に設定することができ、より高精度の測定を行うことができる。

また、図10は、図9の実施形態をアレイ化して、複数の SNP 解析を行うことができる構造としたものを模式的に例示した断面図である。

図10に例示したとおり、遺伝子検出電界効果トランジスタ (1B) が形成された各半導体基板 (3) を核酸プローブ (5) の解離温度に対応させて、最

適な温度に設定できるように、絶縁膜体（19）の一面に設置し、この絶縁膜体（19）を介して熱を効率的に放散させるようとする。さらに、各半導体基板（3）間の温度のクロストークを低減し、独立に温度制御可能にするためにシリコン、ポリシリコン等のような熱伝導性物質（20）で、各遺伝子検出電界効果トランジスタ（1B）（シリコン基板（18））を囲う構造とし、上記熱伝導性物質（20）を介して、熱を効率的に放散させる。

目的遺伝子を含む試料溶液を遺伝子検出電界効果トランジスタ（1B）上に導入するために、上記絶縁膜体（19）に開口部（21）を設け、遺伝子検出電界効果トランジスタ（1B）の絶縁膜体（19）が開口部（21）に一致するようにアライメントする。さらに、銅板（22）に接着したペルチエ素子（23）を銅板（22）の裏面に設けることにより、温度制御の精度を向上して、また冷却時の時間を短縮することができる。このような構造を有する遺伝子検出電界効果トランジスタアレイ（1C）を用いることにより、複数の SNP においても、高精度な解析を並列的に行うことができ、ハイスループットの解析システムを構築することができる。

図11は、この出願の発明における遺伝子検出用電界効果デバイス（1A）を用いた測定システムの一例を模式的に示した概念図である。

すなわち、この出願の発明は、図11に示したとおり、上記のような特徴を有する遺伝子検出電界効果デバイス（1A）（または、遺伝子検出電界効果トランジスタ）をフローセル（24）にマウントし、流路（25）に接続する。流路（25）には緩衝液（28）および洗浄液（29）がバルブ（30）を介して接続されており、ポンプ（31）を駆動して、緩衝液（28）および洗浄液（29）をフローセル（24）に導入することができる。また、試料（26）および伸長反応のための酵素タック DNA ポリメラーゼ（Taq DNA polymerase）および基質となる dATP、dGTP、dCTP、dTTP 等の試薬（27）は分注器（32）によりバルブ（30）中に分注し、フローセル（24）に導入して、遺伝子検出電界効果デバイス（1A）（遺伝子検出用電界効果トランジスタ）と反応させることができる。

反応後、使用済みの液はポンプ（31）により廃液ボトル（33）に送られる。また、参照電極（34）にはAg-AgCl電極を用い、3MのKCl溶液（35）を通過させて上記フローセル（24）の下流で流路（25）に接続し、液-液接合（36）を形成させて、遺伝子検出電界効果デバイス（1A）（遺伝子検出用電界効果トランジスタ）と電気的に接続する。そして、反応後の遺伝子検出電界効果デバイス（1A）（遺伝子検出用電界効果トランジスタ）の出力は、信号処理回路（37）により処理／演算される。

図12は、図11にて例示したフローセル（24）の構造を概略的に例示した図である。フローセル（24）の中のプリント基板（38）に遺伝子検出用電界効果デバイス（1A）をマウントし、ワイヤー（39）で電気的にプリント基板（38）と接続させる。プリント基板（38）には、ピン（40）が設けられ、図11に例示した信号処理回路（37）と接続されている。試料溶液は流路（25）により遺伝子検出用電界効果デバイス（1A）（または、遺伝子検出用電界効果トランジスタ）に導入される。試料溶液が、信号伝導線となるワイヤー（39）に接触しないように、ワイヤー（39）部分を保護キャップ（41）で保護する。保護キャップ（41）の材料としては、絶縁性を有しているものであれば特に制限されるものではないが、たとえば、アクリル、ポリプロピレン、ポリカーボネイト等が適しているため好ましい。

このような構成の遺伝子検出用電界効果デバイス（1A）を用いた測定システムは、フロー方式の測定であるため、多数の試料を連続に自動的に処理することができ、高スループットの測定に有効である。

以上の例に示したとおり、この出願の発明を用いて、遺伝子多型（polymorphism：たとえば、一塩基多型（single nucleotide polymorphism、SNP）やマイクロサテライト多型（microsatellite polymorphism））等を解析する際は、たとえば、図13に例示したとおりの以下のステップで行われる。すなわち：

- (1) 洗浄液をフローセル中に導入；
- (2) 緩衝液をフローセル中に導入（洗浄液を置換）；

(3) 電界効果デバイスの温度を核酸プローブの最適温度に設定；
(4) 各遺伝子検出用電界効果デバイスの出力値を測定、差の演算；
(5) 試料をバルブに分注して、ハイブリダイゼーション液でフローセルに導入；
5 (6) フローセル中でハイブリダイゼーション；
(7) 緩衝液をフローセルに導入して、未反応の試料を除去；
(8) 各遺伝子検出用電界効果デバイスの出力値を測定、差の演算；
(9) 酵素タックポリメラーゼ (Taq polymerase) 、および基質となる dATP、dGTP、dCTP、dTTP の混合液をフローセルに導入し伸長反応；
10 (10) 緩衝液を導入して未反応の酵素・基質を除去；
(11) 各遺伝子検出用電界効果デバイスの出力値を測定、差の演算；
(12) フローセル中の試料温度を 95℃ に設定；
(13) 洗浄液を導入して、フローセル中を洗浄；および
(14) (1) に戻る。
15 なお、この図 13 中の矢印は、出力電位を読み取るタイミングを示している。
以下に実施例を示し、さらに詳しく、この出願の発明について説明する。もちろん、以下の例によってこの出願の発明が限定されることはない。

実施例

20 実施例 1 : FactorVII 遺伝子における SNP の検出解析

血液凝固遺伝子の一つである FactorVII 遺伝子には複数の一塩基多型 (SNP) が存在することが知られている。そのうちの一つである-122 部位の SNP は、野生型 (正常) がチミン (T) 、変異型がシトシン (C) であることが知られている。この FactorVII 遺伝子-122 部位の SNP を検出するために、野生型および変異型それぞれに対応する 11 塩基からなる 2 種類の核酸プローブを合成した。それらの塩基配列は以下のとおりであり、配列番号 1 は野生型核酸プローブを、配列番号 2 は変異型核酸プローブを示している。

野生型核酸プローブ : 5'-CGTCCTCTGAA-3' (配列番号 1)

変異型核酸プローブ：5'-CGTCCTCTGAG-3'（配列番号2）

本実施例においては、上記核酸プローブの3'末端側に SNP 部位の塩基がくるように合成した。すなわち、野生型核酸プローブでは3'末端の塩基がアデニン(A)であり、変異型核酸プローブではグアニン(G)となっている。その他の塩基配列は野生型、変異型ともにすべて同じであり、検出対象の FactorVII 遺伝子にハイブリダイゼーションさせることができる。一方、上記核酸プローブの5'末端側にはアミノ基を修飾して、ゲート絶縁膜体領域表面に固定化した。

また、本実施例における遺伝子検出電界効果トランジスタのゲート絶縁膜には、窒化シリコンによる修飾処理されており、その表面を γ -アミノプロピルトリエトキシシランで化学修飾して窒化半導体基板表面にアミノ基を導入した。そして、核酸プローブのアミノ基と窒化シリコンのアミノ基を、たとえば、グルタルアルデヒド等のような2官能性試薬と反応させ、シップ塩基による結合を形成することにより、核酸プローブを窒化半導体基板表面に固定化させた。

本実施例は、たとえば、前記図5にも例示したとおり、野生型核酸プローブを一つの遺伝子検出電界効果トランジスタのゲート絶縁膜体領域表面に固定化させ、変異型核酸プローブを他の遺伝子検出電界効果トランジスタのゲート絶縁膜体領域表面に固定化させて、あらかじめポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅させた試料を反応させた。

試料は、血液中の白血球からヒトゲノムを抽出し、上記 SNP 部位を含む20塩基長の領域を増幅した後、野生型核酸プローブ、変異型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタに導入して、45°Cで8時間、ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーション後、緩衝液により洗浄して未反応の試料を除去した。

野生型核酸プローブの塩基配列は、野生型試料の塩基配列に完全に相補的であるので、SNP 部位も含めて完全に相補鎖結合して二本鎖DNAを形成した。一方、変異型核酸プローブの場合は、3'末端の塩基がグアニン(G)であるため、野生型試料核酸上の塩基チミン(T)とは相補鎖結合しないため、3'末端が開いた形で二本鎖DNAを形成した。このため、野生型核酸プローブと変異型核酸プローブ

ブとで塩基配列が異なっているため、両者の解離温度 (T_m) が異なり、ハイブリダイゼーション温度を制御することにより、二本鎖形成の選択性を高めることができた。

次に、酵素タック DNA ポリメラーゼ (Taq DNA polymerase) および基質となる dATP、dGTP、dCTP、dTTP の混合液を試料中に導入して、温度を 62°C に設定してゲート絶縁膜体上で伸長反応を行った。前記図 6 に例示したとおり、野生型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタでは、野生型

(正常型) の目的遺伝子を含む試料の導入により末端を含めて完全相補鎖の二本鎖を形成するため、伸長反応により二本鎖が合成された。この伸長反応により野生型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力が 20mV 变化した。一方、変異型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタでは、3' 末端の塩基が結合せず開いた形のため、伸長反応が起こらない。したがって、変異型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力は、ほとんど変化しなかった (およそ、1mV の変化)。

一方、変異型の目的遺伝子のみを含む試料を導入すると、変異型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタのみで伸長反応が起き、その出力が 18mV 变化した。この場合は、野生型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力は、ほとんど変化せず、0.5mV の変化を示した。野生型、変異型の両方の目的遺伝子を含む試料を導入した場合は、両方の遺伝子検出電界効果トランジスタの出力が変化し、野生型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力は 12mV の変化を示し、変異型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力は 10mV の変化を示した。

以上のことから、3' 末端の塩基が SNP 部位となるように核酸プローブを設計し、野生型と変異型の核酸プローブがそれぞれ遺伝子検出電界効果トランジスタのゲート絶縁膜体上に固定化され、目的遺伝子を含む試料溶液とハイブリダイゼーションを行わせ、引き続き伸長反応を行わせることにより、試料溶液中の遺伝子の SNP を検出することができる。さらに、野生型と変異型の核酸プロ

ープが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力変化の大きさを比較することにより、野生型のホモザイゴート (homozygote) 、野生型と変異型のヘテロザイゴート (heterozygote) 、変異型のホモザイゴートを識別することができ、遺伝子型 (genotype) を検出することができることが確認された。

5 実施例 2 : FactorVII 遺伝子における SNP 検出において、ペプチド核酸 (Peptide Nucleotide Acid, PNA) を用いた場合

上記の実施例 1 において、遺伝子検出電界効果トランジスタのゲート絶縁膜体領域上に固定化される核酸プローブとして、ペプチド核酸 (Peptide Nucleotide Acid, PNA) を用いると、より安定性の高い二本鎖核酸が形成される。

そこで、本実施例では、基本的な特徴は、上記実施例 1 の場合と略同様であるが、核酸プローブとしてペプチド核酸 (PNA) を用いた。

その結果、野生型ホモザイゴート (homozygote) を含む試料の場合、野生型 PNA プローブを固定化したトランジスタの出力は 23mV 変化したのに対して、変異型 PNA プローブを固定化したトランジスタの出力は 4mV の変化であった。また、野生型と変異型のヘテロザイゴート (heterozygote) 試料の場合、野生型、変異型 PNA プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力は、それぞれ 15mV、13mV であり、野生型、変異型ともに検出することができた。

さらに、変異型のホモザイゴート試料の場合、野生型 PNA プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力は、2mV とほとんど変化を示さなかつたのに対して、変異型 PNA プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力は、19mV の変化であった。

以上のとおり、核酸プローブとして PNA を用いることにより、野生型ホモザイゴート、野生型と変異型との混合ヘテロザイゴート、変異型ホモザイゴートを識別することができ、目的遺伝子の遺伝子型 (genotype) を検出することができることが確認された。

これは、PNA は、負電荷を有するオリゴヌクレオチドや cDNA 等と異なり、電荷を有しておらず中性のため、核酸プローブと目的遺伝子との間の静電反発が

無く、ゲート絶縁膜体上で、強固な二本鎖核酸を形成することができる。また、核酸プローブを形成した遺伝子検出用電界効果デバイスと核酸プローブを形成しない参照用の遺伝子検出用電界効果デバイスを用いて差動測定を行う場合、電荷が中性の PNA を用いると遺伝子検出用と参照用の電界効果デバイスの間で 5 フラットバンド電圧や閾値電圧の変化が無く、高精度の差動測定を行うことができ、特に電荷検出型の遺伝子検出用電界効果デバイスには有効であることを意味する。

そして、本実施例のように遺伝子検出電界効果トランジスタと伸長反応を利用する SNP 検出およびジェノタイピング (genotyping) では、ゲート絶縁膜体 10 上への試料導入、ハイブリダイゼーション、伸長反応の各プロセスの進行中、常時電位計測を行い反応の進行をモニタリングすることができる。

したがって、反応の完了を電位変化から検出することができ、効率的に SNP 検出およびジェノタイピングを行うことができる。また、本実施例では伸長反応に伴う塩基の合成を電荷の増加量として検出するため、核酸プローブと試料 15 核酸の塩基長および伸長合成される塩基長を最適化することにより高感度に核酸を検出することができる。

実施例 3：アルコールデヒドロギナーゼ関連遺伝子の SNP 検出アルコールデヒドロギナーゼ関連遺伝子には、一塩基多型 (SNP) が存在することが知られている。その SNP 部位が、3' 末端の塩基となるように核酸プローブを設計 20 した。野生型は SNP 部位の塩基がチミン (T) 、変異型はシトシン (C) であり、それぞれに対応する核酸プローブの塩基配列を以下に示した。なお、本実施例における野生型核酸プローブは配列番号 3 に示し、変異型核酸プローブ配列番号 4 に示した。

野生型核酸プローブ：5'-CATACACTA-3' (配列番号 3)

25 変異型核酸プローブ：5'-CATACACTG-3' (配列番号 4)

なお、本実施例は、基本的な構成や実験手順は、上記実施例 1 および実施例 2 と略同様である。

本実施例は、たとえば、前記の図 7 に例示したとおり、(A) に示した野生型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタおよび(B) に示した変異型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタを用いた。本実施例では、遺伝子検出電界効果トランジスタのゲート絶縁膜体には 5 金属電極を形成させ、上記核酸プローブの 5' 末端をチオール基で修飾し、直接金属電極と結合を形成させることにより、核酸プローブをゲート絶縁膜体領域表面に固定化させた。本実施例において、金属電極として、クロム薄膜の上に金を積層した構造を用いた。

試料は、血液中の白血球からヒトゲノムを抽出し、上記 SNP 部位を含む 100 塩基長の領域を増幅した後、野生型または変異型核酸プローブが固定化された 10 遺伝子検出電界効果トランジスタに導入して、45℃で 8 時間、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、緩衝液で洗浄して未反応の試料を除去した。

本実施例で用いた試料は、野生型の目的遺伝子のみを含む試料であったため、 15 野生型核酸プローブと完全相補鎖結合により二本鎖が形成された。一方、変異型核酸プローブは、3' 末端に SNP が存在するため相補鎖結合されず、3' 末端が開いた形で二本鎖を形成された。

次に、上記の実施例 1 および実施例 2 と同様に、タック DNA ポリメラーゼ (Taq DNA polymerase) および基質となる dATP、dGTP、dCTP、dTTP の混合液を 20 試料中に導入し、温度を 62℃に設定してゲート絶縁膜体上で伸長反応を行った。

そして、野生型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタでは、上記のとおり野生型目的遺伝子のみを含む試料の導入により、末端を含めて完全相補鎖の二本鎖を形成するので、伸長反応が促進され、出力が 28mV の変化を示した。一方、変異型核酸プローブが固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタでは、3' 末端の塩基が結合されず開いた形のため、伸長反応が 25 起こらず、出力はほとんど変化しなかった (3mV の変化)。

本実施例の特徴は、伸長反応の後、二本鎖の核酸と反応するインターラーカラーを導入した点である。インターラーカラーは、分子生物学実験において螢

光色素として一般に用いられている。多くのインターラーカレーター分子は、溶液中でイオン化し、正に帯電する。

つまり、この出願の発明においてのインターラーカレーターは、色素としての性質ではなく、電荷としての性質を利用した。本実施例では、インターラーカレーター 5 として、Hoechst33258 を用いた。

すなわち、ハイブリダイゼーション、それに続く伸長反応の後、野生型および変異型核酸プローブそれぞれが、固定化された遺伝子検出電界効果トランジスタの出力電位を測定し、Hoechst33258 をゲート絶縁膜体上に導入して反応させた。

10 そして、たとえば、前記図 8 に例示したように、インターラーカレーターである Hoechst33258 は、二本鎖核酸とのみ反応して、伸長反応により長く伸びた野生型トランジスタの二本鎖核酸とより多く反応し、大きな信号変化が得られた。

本実施例の場合では、Hoechst33258 との反応後、野生型トランジスタの出力電位は 27mV 変化し、変異型トランジスタの出力電位は 6mV であった。これにより、SNP 検出および野生型／野生型のホモ、変異型／変異型のホモ、野生型／変異型のヘテロの 3 種類の試料を識別する遺伝子型の検出を行うことができる。

Hoechst33258 等のインターラーカレーターを用いる方法の大きな特長は、上記のとおり、インターラーカレーターは正の電荷を有しているため、負に帯電している核酸のハイブリダイゼーションおよび伸長反応に基づく出力変化と反対の極性 20 の信号を出力する点である。インターラーカレーターは二本鎖核酸とのみ反応するので、非特異的にゲート絶縁膜体上に吸着した一本鎖核酸とは反応せず、ハイブリダイゼーション・伸長反応に基づく信号と、非特異的に吸着した一本鎖核酸の信号を分離して、ハイブリダイゼーション・伸長反応に基づく信号のみを選択的に検出できる。これにより、高い信号／雑音比 (S/N 比) で SNP および遺 25 伝子型を検出することができる。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、高感度、かつ、高精度に遺伝子の検出解析が可能であり、しかも、遺伝子多型解析システムを従来よりも小型でコストをも抑えることができる。

請求の範囲

1. 絶縁膜体、半導体基板および参照電極が備えられている遺伝子検出電界効果デバイスであって、以下の構成：
 - 5 (a) 絶縁膜体は、その一方の面側に核酸プローブが固定化されているとともに、少なくとも 1 種類の目的遺伝子が含まれる試料溶液に接触されていること；
(b) 半導体基板は、前記絶縁膜体の他方の面側に当接設置されていること；
および
 - 10 (c) 参照電極は、前記試料溶液中に備えられていること；
を含んでなることを特徴とする遺伝子検出電界効果デバイス。
2. 請求項 1 記載の遺伝子検出電界効果デバイスが、少なくとも 2 つ以上備えられており、かつ、これら遺伝子検出電界効果デバイスそれぞれの絶縁膜体上には目的遺伝子の塩基配列と相補的な塩基配列を有する野生型（正常型）核酸プローブと、目的遺伝子の塩基配列と非相補的な塩基配列を有する変異型核酸プローブの少なくとも 2 種類以上の核酸プローブが固定化されてなることを特徴とする遺伝子検出電界効果デバイス。
3. 変異型核酸プローブは、核酸プローブが絶縁膜体上に固定化されていない端部である非固定化端部における塩基が、野生型核酸プローブの非固定化端部における塩基と異なっている請求項 2 記載の遺伝子検出電界効果デバイス。
4. 核酸プローブは、オリゴヌクレオチド、相補的 DNA (cDNA) およびペプチド核酸 (PNA) からなる群より少なくとも 1 種類以上が選択される請求項 1 から 3 いずれか記載の遺伝子検出電界効果デバイス。
5. 核酸プローブは、金属電極を介して固定化されている請求項 1 から 4 いずれか記載の遺伝子検出電界効果デバイス。
6. 金属電極は、白金、金、銀、パラジウム、チタンおよびクロムからなる群より少なくとも 1 種類以上が選択される請求項 5 記載の遺伝子検出電界効果デバイス。

7. ヒーターおよび温度センサが、さらに集積化されている請求項 1 から 6 いずれか記載の遺伝子検出電界効果デバイス。

8. 請求項 1 から 7 いずれか記載の遺伝子検出電界効果デバイスを用いて、遺伝子多型を解析する方法であって、以下のステップ：

5 (a) 絶縁膜体に固定化されている核酸プローブと少なくとも目的遺伝子が含まれている試料溶液とを接触させることにより、絶縁膜体上で前記核酸プローブと前記目的遺伝子とをハイブリダイズさせるステップ；

(b) 洗浄液を絶縁膜体上に導入して、未反応の前記目的遺伝子を除去するステップ；

10 (c) 伸長反応における酵素であるタック DNA ポリメラーゼ (Taq DNA polymerase) および基質となるデオキシアデノシン三リン酸 (dATP) 、デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP) 、デオキシシチジン三リン酸 (dCTP) 、デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) を絶縁膜体上に導入して伸長反応を行うステップ；

15 (d) 洗浄液を絶縁膜体上に導入して、未反応の酵素および基質を除去するステップ；および

(e) 緩衝液を絶縁膜体上に導入して、遺伝子検出電界効果デバイスの出力値を測定するステップ；

を含むことを特徴とする遺伝子多型解析方法。

20 9. ステップ (e) の出力値の測定は、野生型核酸プローブが固定化されている第 1 の遺伝子検出電界効果デバイスと絶縁膜体上に核酸プローブが固定化されていない第 3 の遺伝子検出電界効果デバイスとの差動出力値 V_1 を測定し、また、変異型核酸プローブが固定化されている第 2 の遺伝子検出電界効果デバイスと前記第 3 の遺伝子検出電界効果デバイスとの差動出力値 V_2 を測定し、 V_1 が V_2 より大きいパターン ($V_1 > V_2$) 、 V_1 と V_2 とが同程度であるパターン ($V_1 \approx V_2$) および V_1 が V_2 より小さいパターン ($V_1 < V_2$) の 3 種類のパターンに分類して表示する請求項 8 記載の遺伝子多型解析方法。

図 1

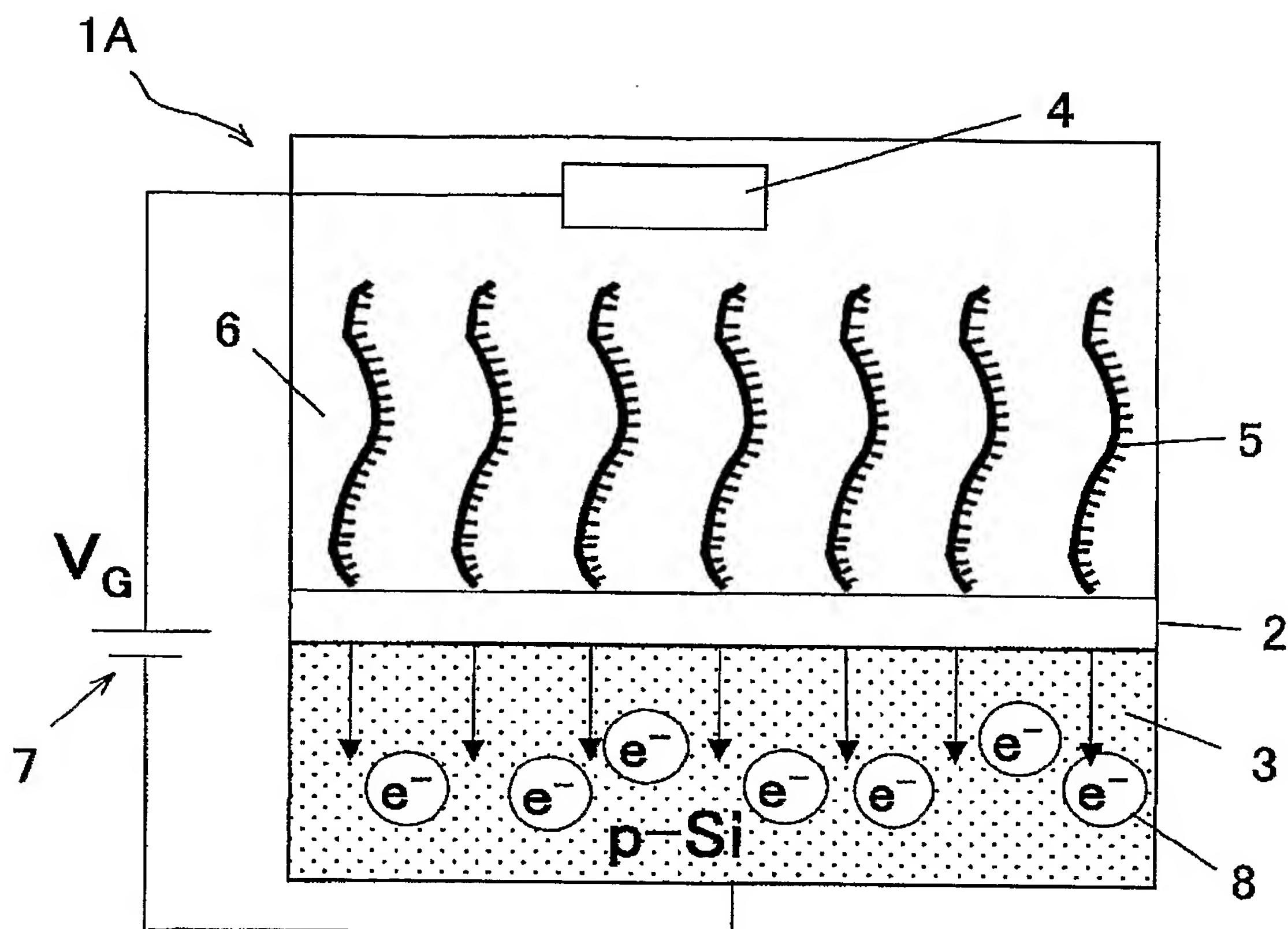


図 2

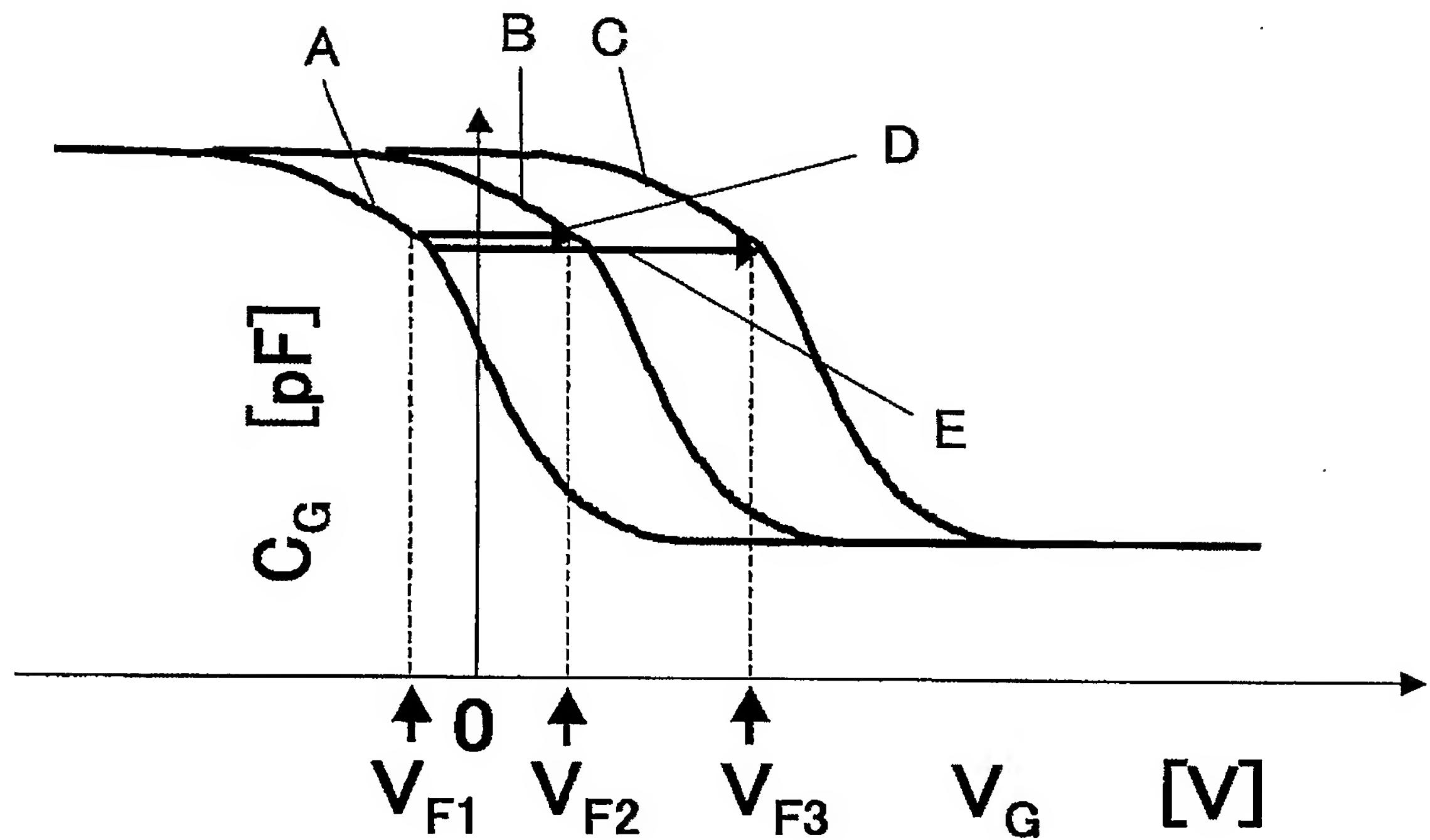


図 3

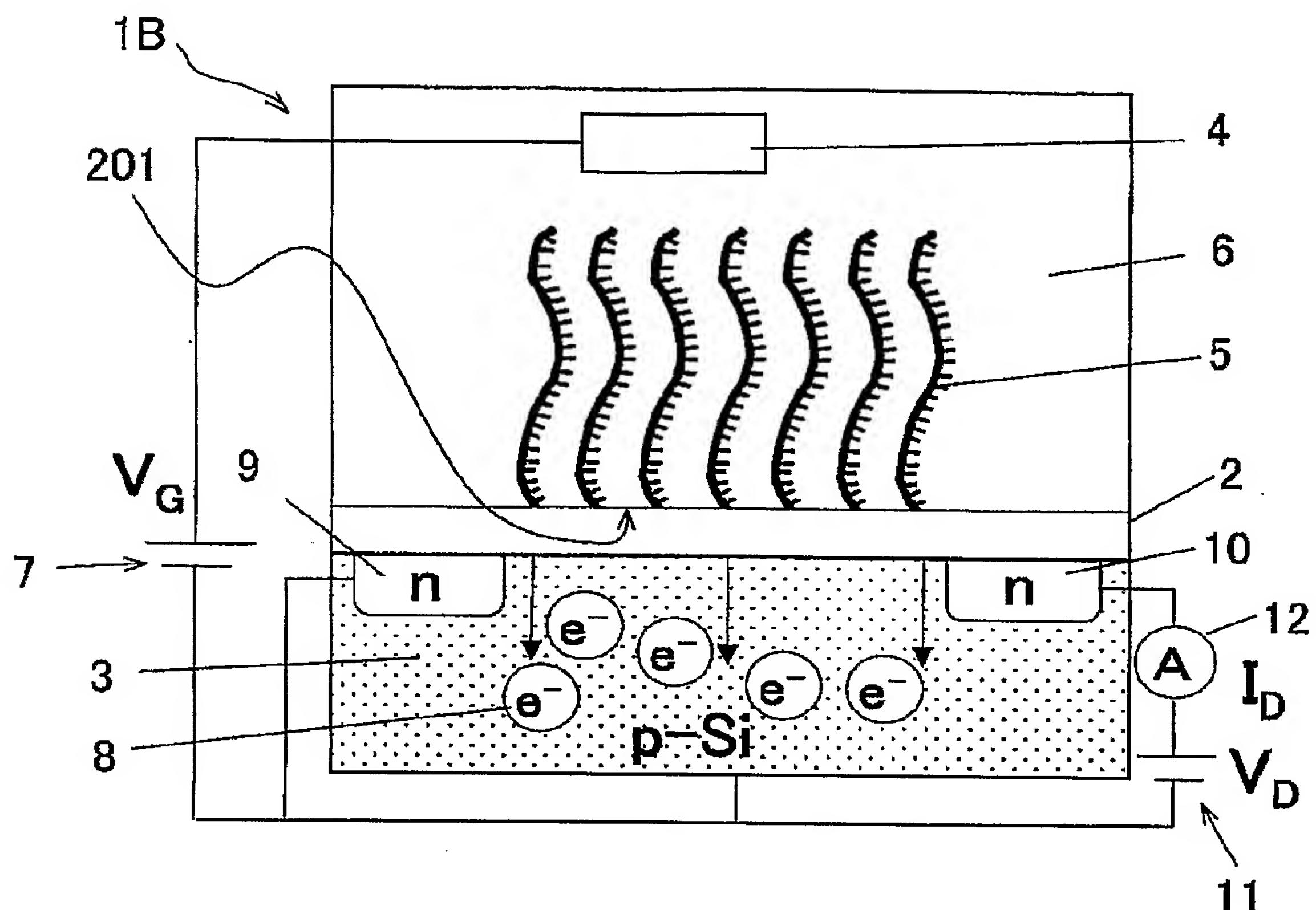


図 4

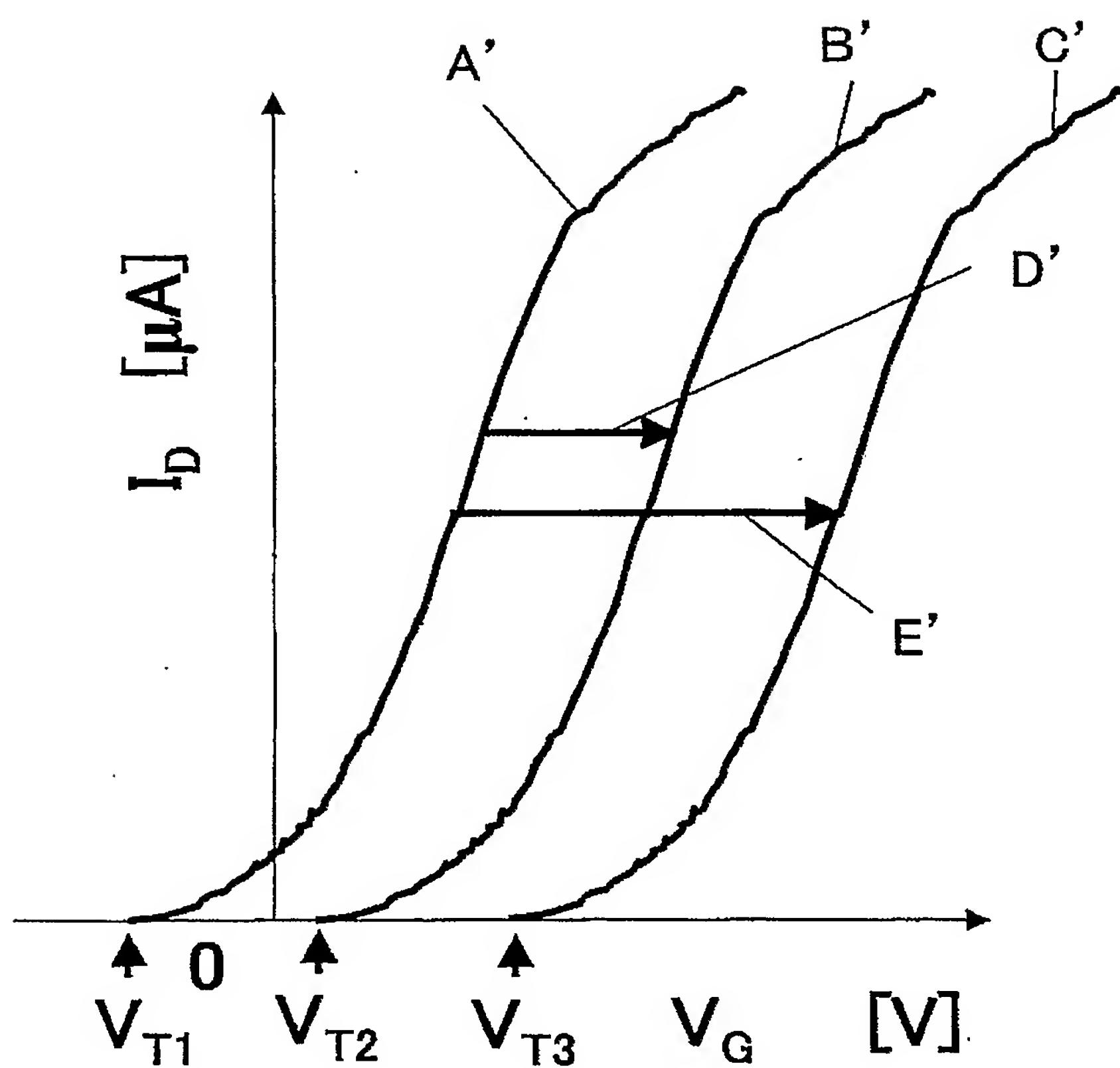


図 5

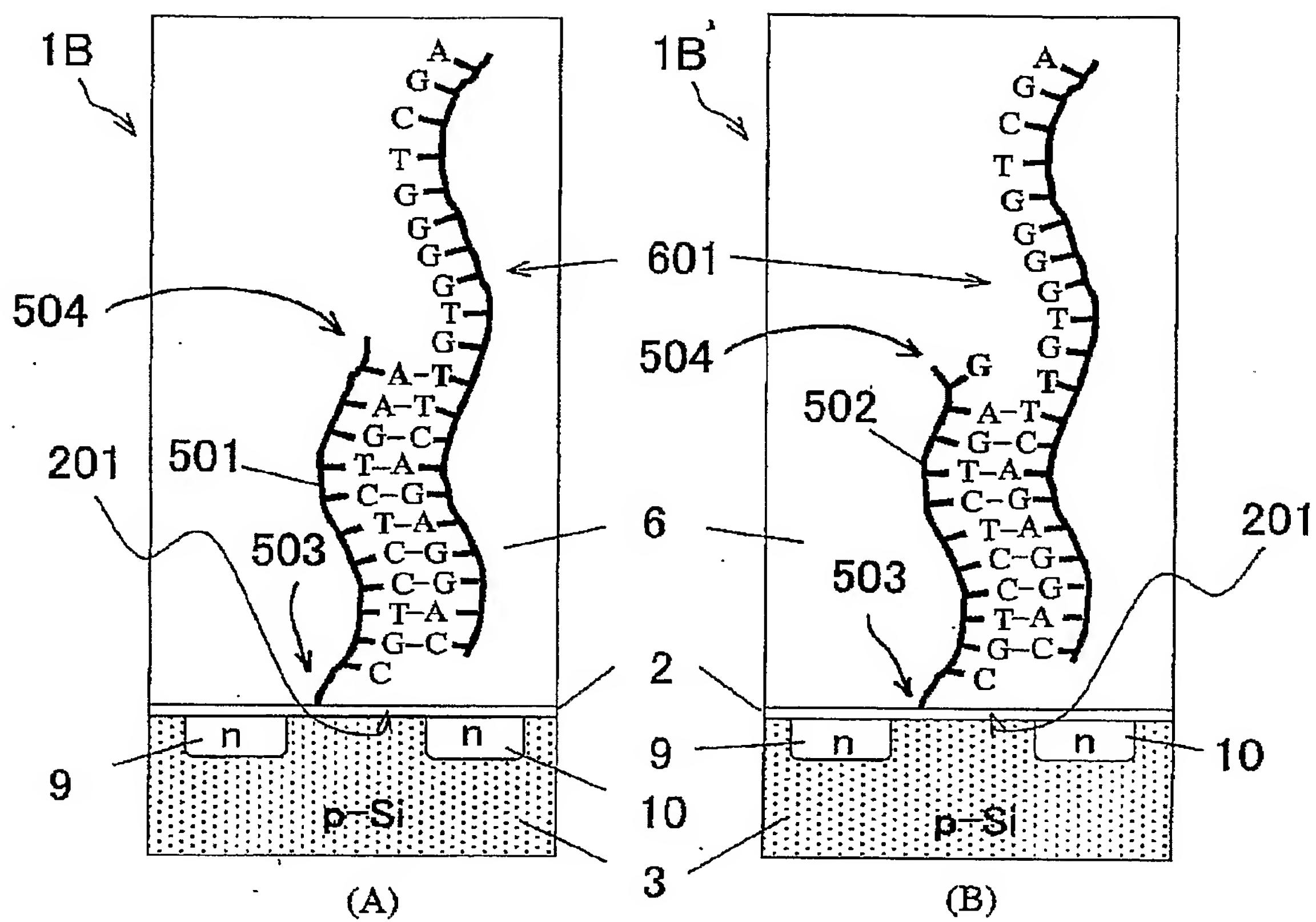


図 6

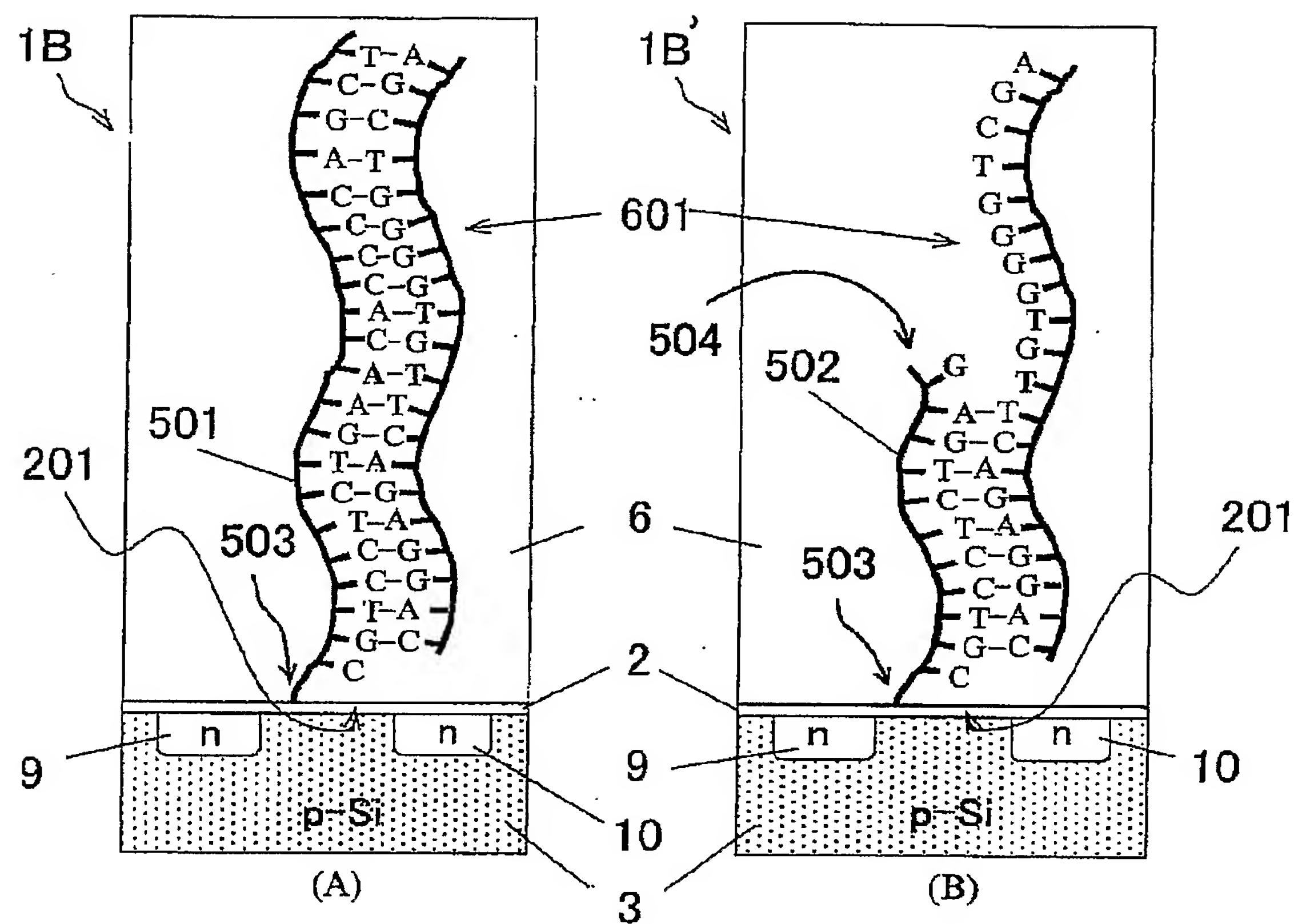
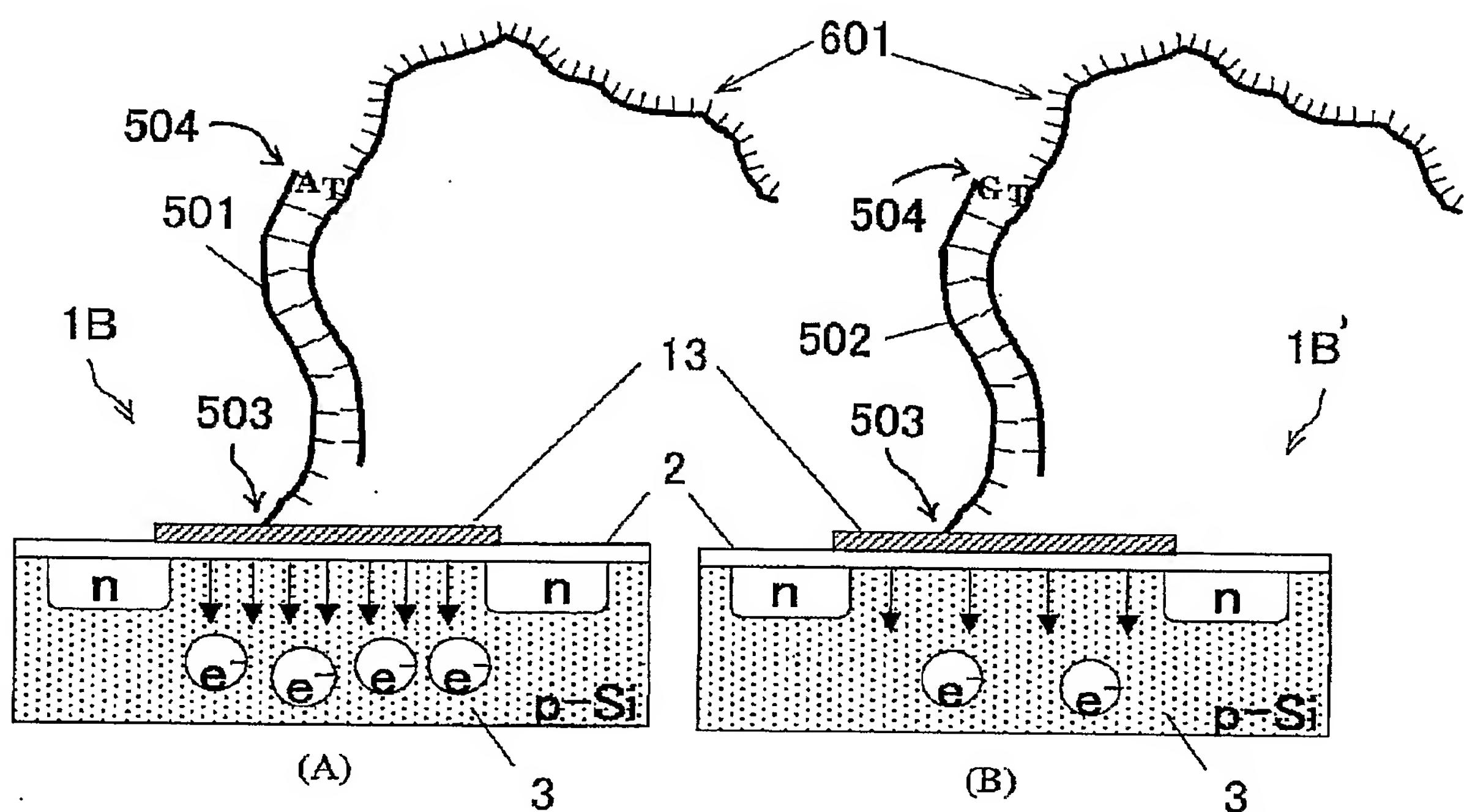
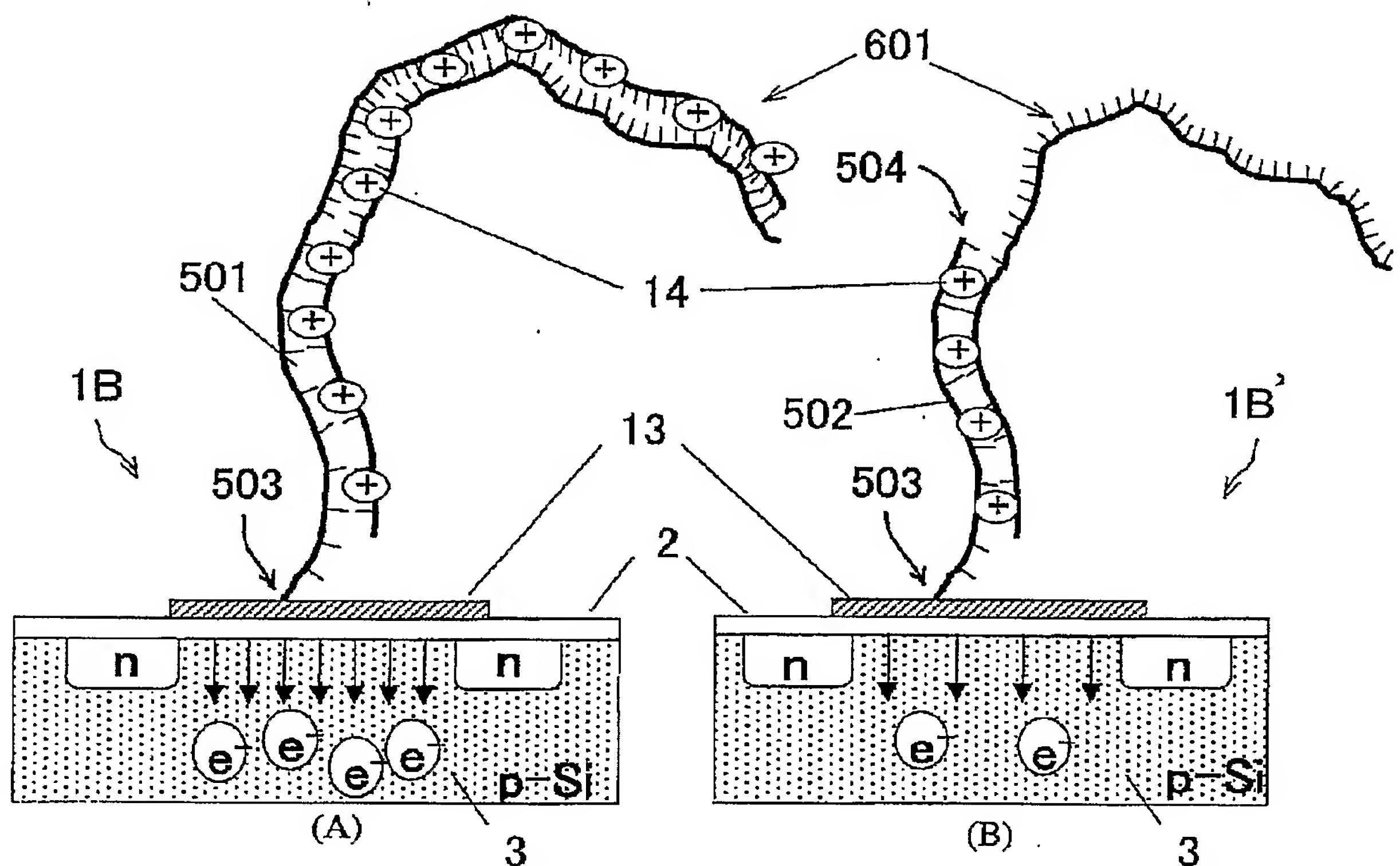


図 7



8



四 9

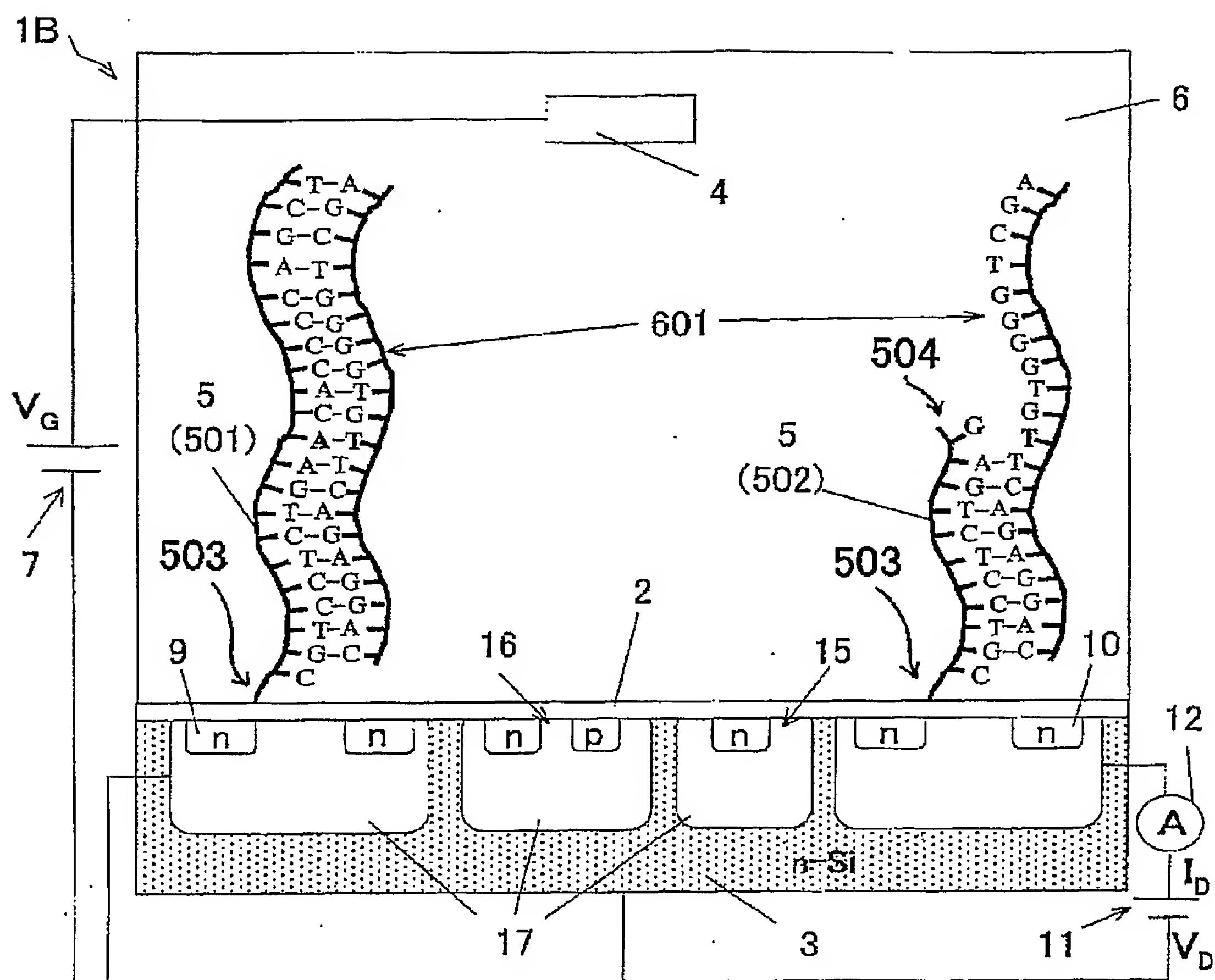


図 10

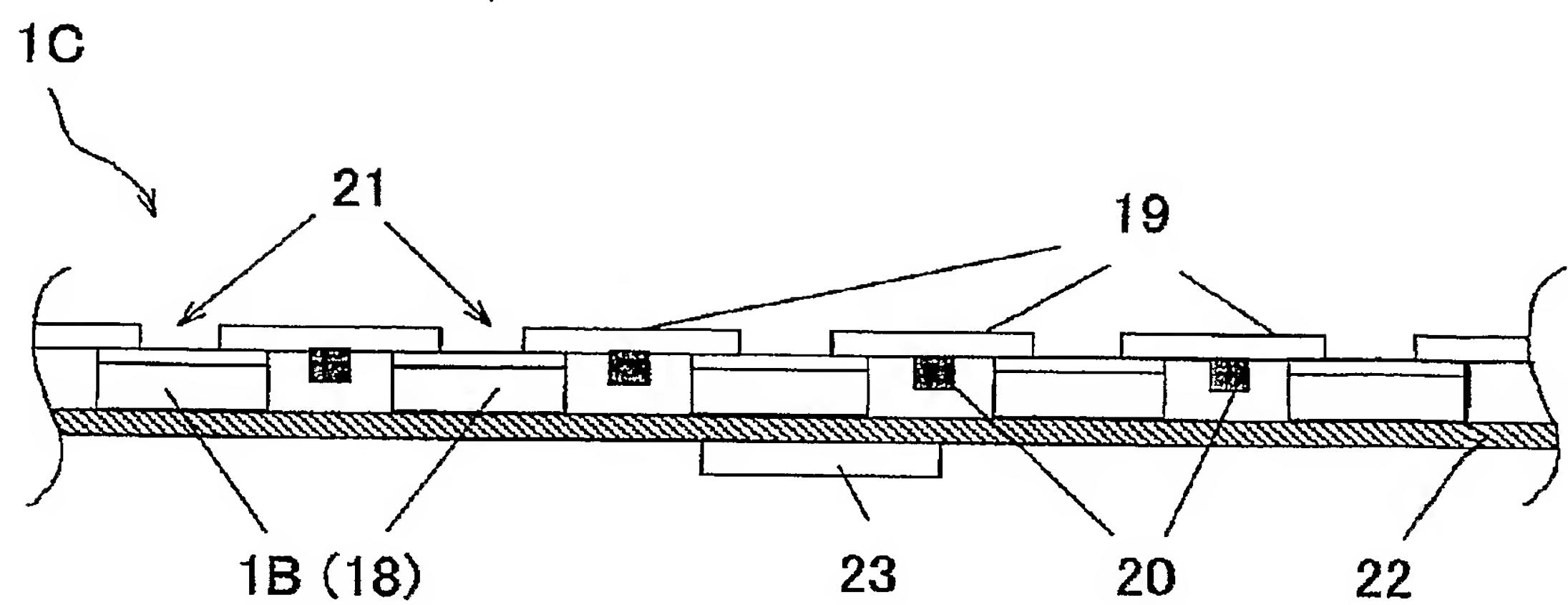


図 11

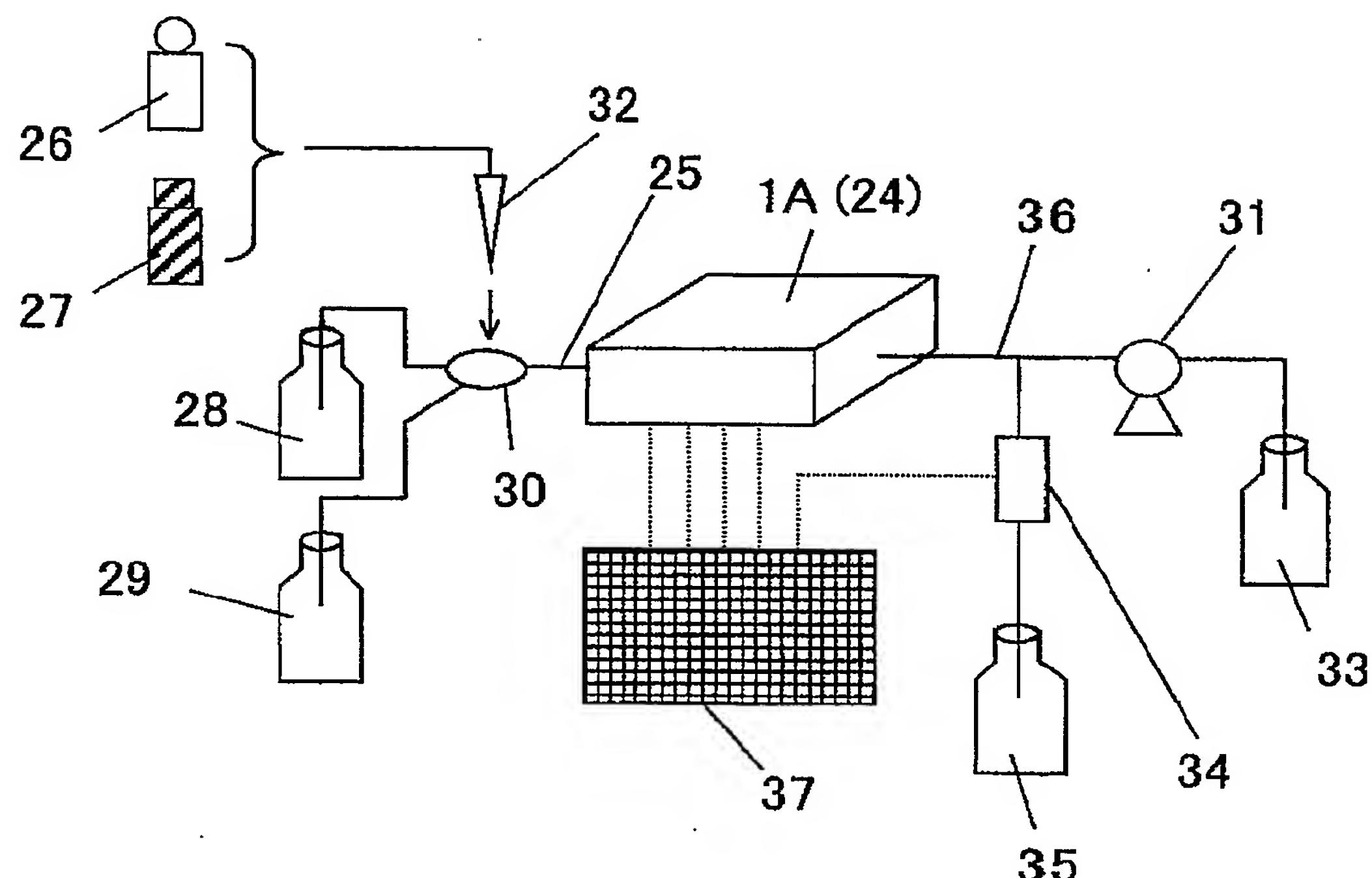


図12

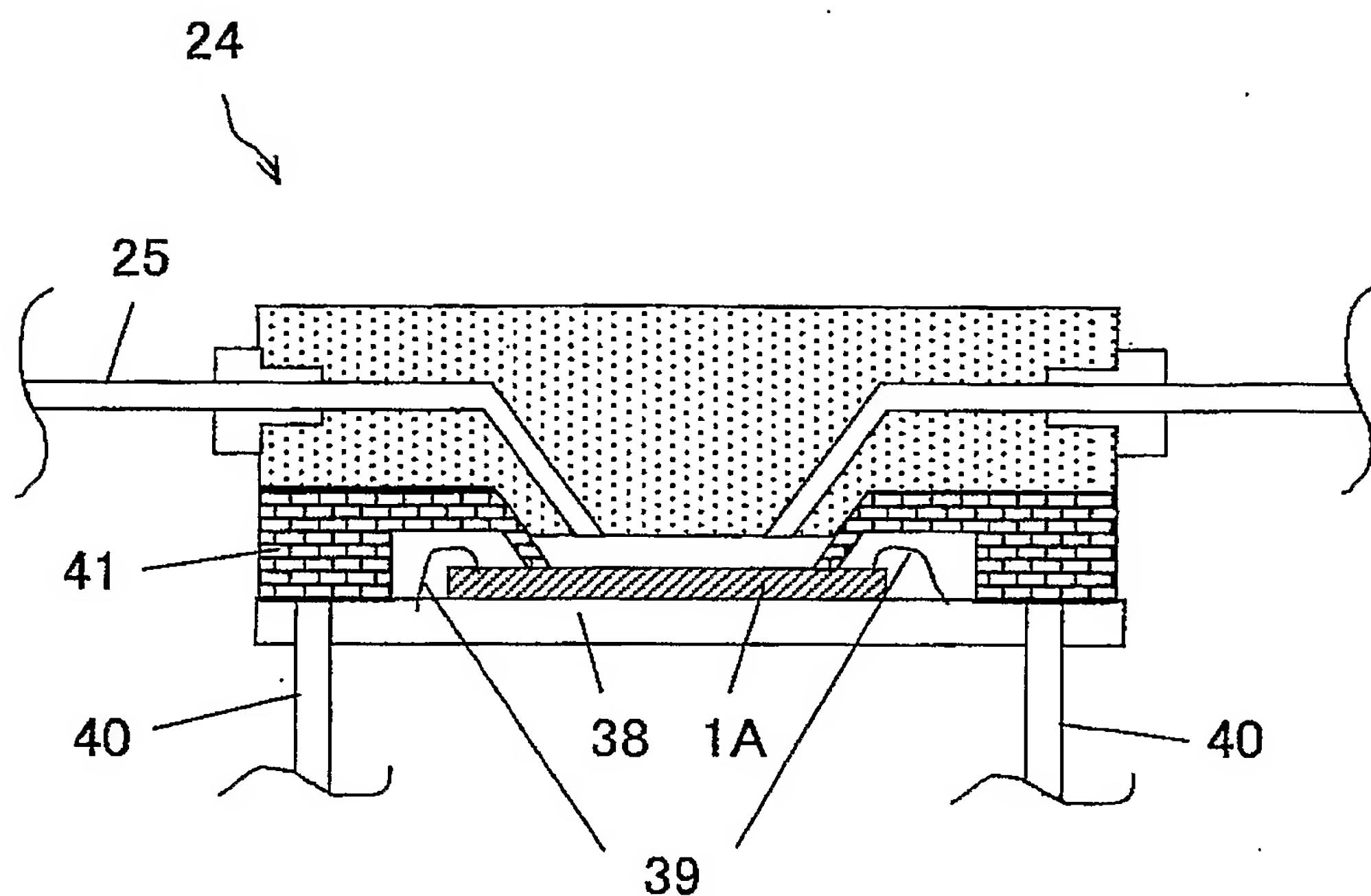
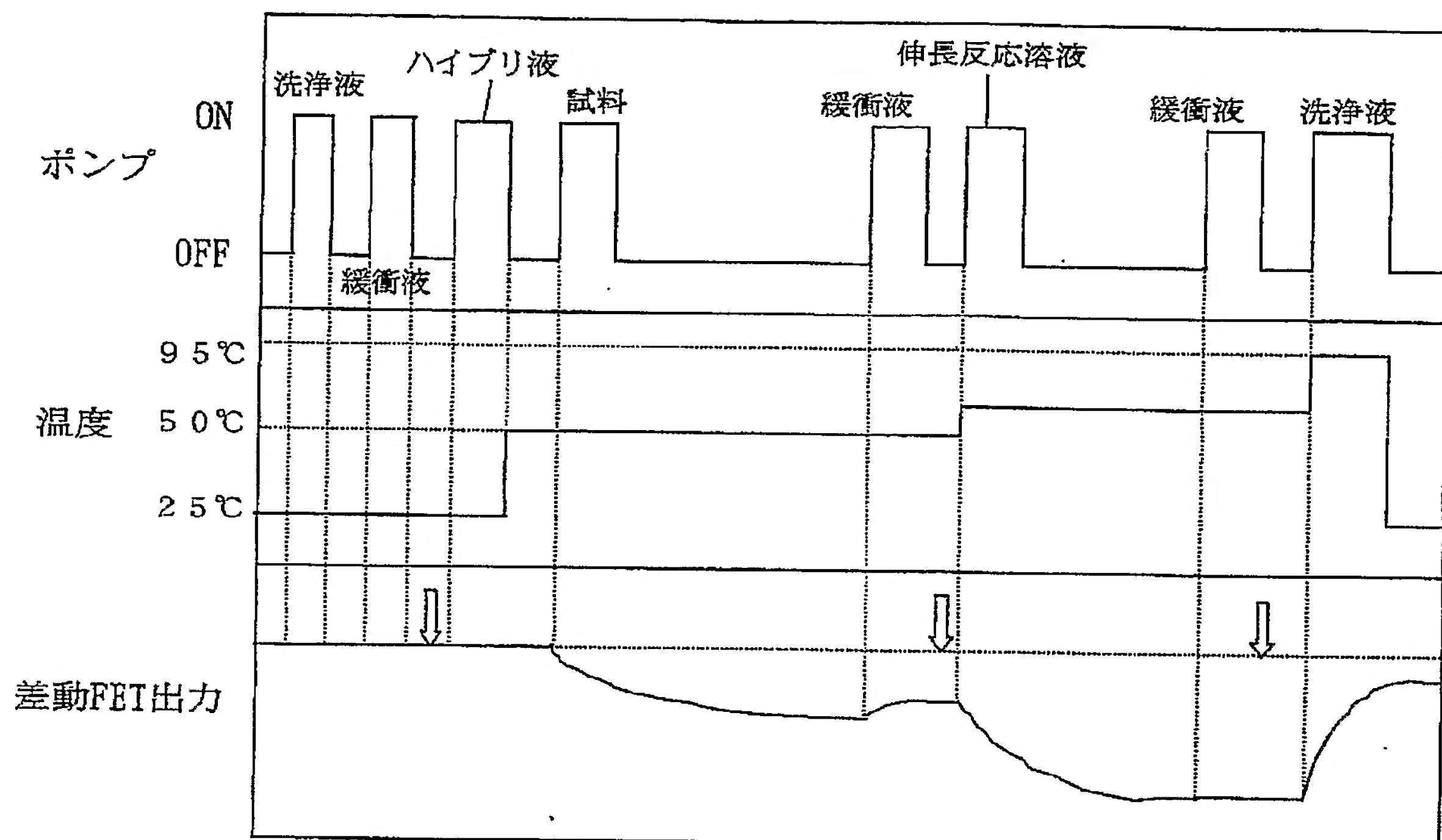


図 13



SEQUENCE LISTING

<110> National Institute for Materials Science

<120> An Electric-Field Effect Device for Gene Detection and An Analysis for Polymorphism with The Device

<130> 05-F-007PCT

<150> JP 2004-026821

<151> 2004-02-03

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FactorVII, normal

<400> 1

cgtcctctga a

11

<210> 2

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FactorVII, mutant

<400> 2

cgtcctctga g

11

<210> 3
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alcohol dehydrogenase, normal

<400> 3
catacacta

9

<210> 4
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alcohol dehydrogenase, mutant

<400> 4
catacactg

9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00, G01N27/30, G01N27/414

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00, G01N27/30, G01N27/414

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yuji MIYAHARA et al., "Denkai Koka Transistar ni yoru DNA no Potentiometric Keisoku", Dai 64 Kai Extended abstracts; the Japan Society of Applied Physics, 2003, No.3, page 1180	1-7 8, 9
X Y	Yuji MIYAHARA et al., Micromachine no Biochip Oyo", Proceeding of the Institute of Electrostatics Japan, 2003, Vol.27, pages 268 to 272	1-7 8, 9
X Y	Toshiya SAKATA et al., "Idenshi Transistor ni yoru DNA Hybridization no Keishutsu", Dai 64 Kai Extended abstracts; the Japan Society of Applied Physics, 2003, No.3, page 1179	1-7 8, 9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March, 2005 (17.03.05)

Date of mailing of the international search report

05 April, 2005 (05.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001987

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Toshiya SAKATA et al., "Idenshi Transistor ni yoru DNA no Potentiometric Keisoku", Denki gakkai Kenkyukai Shiryo Chemical Sensor Kenkyukai, 2003, CHS-03-51-55, pages 1 to 5	1-7 8, 9
Y	JP 2002-272463 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 24 September, 2002 (24.09.02), Full text (Family: none)	8, 9
Y	WO 2001/42498 A1 (Toyobo Co., Ltd.), 14 June, 2001 (14.06.01), Full text & EP 1241266 A1 & US 2003/0148301 A1	8, 9
Y	Zhou G. et al., Quantitative detection of single nucleotide polymorphisms for a pooled sample by a bioluminometric assay coupled with modified primer extension reactions (BAMPER), Nucleic Acids Res., 2001, Vol.29, E93	8, 9
P, X	Toshiya SAKATA et al., "Iden Toransistor ni yoru DNA Shincho Hanno no Denki Shingo eno Chokusetsu Henkan", Dai 51 Kai Oyo Butsuringaku Kankei Rengo Koenkai Koen Yokoshu, 2004 Mar., Vol.51, page 1429	1-9
P, X	Toshiya SAKATA et al., "Idenshi Toransistor ni yoru Ichienki Tagata no Kenshutsu", Denki Gakkai Kenkyukai Shiryo Chemical Sensor Kenkyukai, 2004 May, CHS-04-1-13, pages 45 to 50	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00, G01N27/30, G01N27/414

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00, G01N27/30, G01N27/414

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	宮原裕二ら, 電界効果トランジスタによるDNAのポテンシオメトリック計測, 第64回応用物理学会学術講演会講演予稿集, 2003, No. 3, p. 1180	1-7 8, 9
X Y	宮原裕二ら, マイクロマシンのバイオチップ応用, 静電気学会誌, 2003, Vol. 27, p. 268-272	1-7 8, 9
X Y	坂田利弥ら, 遺伝子トランジスタによるDNAハイブリダイゼーションの検出, 第64回応用物理学会学術講演会講演予稿集, 2003, No. 3, p. 1179	1-7 8, 9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.03.2005

国際調査報告の発送日

05.4.2005

国際調査機関の名称及び先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B 3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X Y	坂田利弥ら, 遺伝子トランジスタによるDNAのポテンシオメトリック計測, 電気学会研究会資料ケミカルセンサ研究会, 2003, CHS-03-51-55, p. 1-5	1-7 8、9
Y	JP 2002-272463 A (オリンパス光学工業株式会社) 2002.09.24, 全文 (ファミリーなし).	8、9
Y	WO 2001/42498 A1 (東洋紡績株式会社) 2001.06.14, 全文 & EP 1241266 A1 & US 2003/0148301 A1	8、9
Y	Zhou G. et al., Quantitative detection of single nucleotide polymorphisms for a pooled sample by a bioluminometric assay coupled with modified primer extension reactions (BAMPER), Nucleic Acids Res., 2001, Vol. 29, E93	8、9
P X	坂田利弥ら, 遺伝子トランジスタによるDNA伸長反応の電気信号への直接変換, 第51回応用物理学関係連合講演会講演予稿集, 2004 Mar., Vol. 51, p. 1429	1-9
P X	坂田利弥ら, 遺伝子トランジスタによる一塩基多型の検出, 電気学会研究会資料ケミカルセンサ研究会, 2004 May, CHS-04-1-13, p. 45-50	1-9